

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

***PREVALENCIA DE LA MUTACIÓN EN EL FACTOR V (G1691A) FACTOR II
(G20210A) Y LA METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA (MTHFR C677T) EN
PACIENTES CON RIESGO DE TROMBOFILIA Y POBLACIÓN SANA DE PANAMÁ***

JOSÉ A CEDEÑO E

**TESIS PRESENTADA COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL
GRADO DE MASTER EN BIOTECNOLOGÍA**

PANAMÁ REPUBLICA DE PANAMÁ

2014

DEDICATORIA

Dedico este Trabajo a Dios por que todo se lo debo a él por ser mi vida mi sustento mi fortaleza

A mi esposa Emma y mis hijos Jose Antonio Sofia y Diego Los Amo

José Antonio

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primero a Dios por guiar siempre mi camino y responder mis oraciones siempre que lo busco

Al Dr Luis Sotillo director de mi tesis por toda su ayuda y permitirme desarrollar este tema de investigación

Agradezco a mis padres Jose Agustin y Sonia por darme la vida y siempre estar presente cuando los necesito

A toda mi familia en especial a mi esposa Emma y mis hijos Jose Antonio Sofia y Diego

A la Licda Mirtha Frias por todo sus consejos apoyo y darme animo en el cumplimiento de mis metas

Al Prof Tomás Díez Prof Magalys Chial y Prof Carlos Ramos por brindarme sus conocimientos en todo el transcurso de la Maestria en Biotecnología

A todo el personal del laboratorio de Genetica que me apoyo en el desarrollo de esta investigación

José Antonio

INDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS GENERALES Y ESPECIFICOS	10
Objetivo General	10
Objetivos Especificos	10
CAPITULO I	11
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	11
1 1 GENERALIDADES	12
1 2 HEMOSTASIS Y REGULACIÓN DE LA COAGULACIÓN	13
1 3 FACTORES DE RIESGO	17
1 3 1 FACTORES DE RIESGO ADQUIRIDOS	19
1 3 1 1 Cirugia Ortopédica mayor (Reemplazo de cadera o rodilla)	19
1 3 1 2 Fractura de pelvis cadera o huesos largos	19
1 3 1 3 Cirugia general mayor	19
1 3 1 4 Trauma multiple y daño a la médula espinal	20

1 3 1 5	Quimioterapia y malignidad	20
1 3 1 6	Cirugía de rodilla artroscópica	20
1 3 1 7	Anticonceptivos orales y embarazo	21
1 3 1 8	Terapia de Reemplazo Hormonal	21
1 3 1 9	Tromboembolismo venoso previo	21
1 3 1 10	Inmovilidad prolongada debido a viajes en carro o avión	22
1 3 1 11	Venas várices	22
1 3 1 12	Edad	22
1 3 1 13	Obesidad	22
1 3 2	FACTORES DE RIESGO HEREDITARIOS	23
1 4	DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LAS TROMBOFILIAS	23
1 4 1	Factor V de Leiden	25
1 4 2	Mutaciones en la Protrombina	29
1 4 3	Polimorfismos en la enzima Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)	31
1 5	TROMBOFILIA E IMPACTO EN EL EMBARAZO	34
1 6	PRUEBAS GENETICAS PARA DETECCIÓN DE ALTERACIONES EN FACTORES DE COAGULACIÓN	40

CAPITULO II	44
DISEÑO METODOLÓGICO	44
2 DISEÑO EXPERIMENTAL	45
2.1 TIPO DE ESTUDIO	45
2.2 POBLACIÓN A ESTUDIO	45
2.3 MÉTODOS	46
CAPITULO III	55
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
3.1 RESULTADOS	56
3.2 DISCUSIÓN	65
CONCLUSIONES	71
RECOMENDACIONES	73
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
ANEXOS	82

ÍNDICE DE TABLAS

Nº	Título	Págs
1	Prevalencia de trombofilia hereditaria como causa de PGR, en diversas publicaciones	37
2	Publicaciones que estudian la asociación de trombofilia y perdida gestacional recurrente	38
3	Metodos disponibles para la detección de factor V de Leiden y Factor II G20210A	41
4	Preparación de la Enzima Taq Polimerasa	48
5	Preparación de las Mezclas de reacción A y B	49
6	Tabla tetracórica (2x2) utilizada para comparar prevalencias y cálculos de Odds Ratio	54
7	Frecuencia genotipica del Factor V G1691A Factor II G20210A y MTHFR C677T en el grupo de pacientes PGR y Control	59
8	Prevalencia de la mutación en el Factor V G1691A Factor II G20210A y MTHFR C677T en el grupo B (Trombosis) y grupo control B	60
9	Frecuencia genotipica del Factor V G1691A Factor II G20210A y MTHFR C677T en el grupo de pacientes con Trombosis y Control	60
10	Prevalencia de la mutación en el Factor V G1691A Factor II G20210A y MTHFR C677T en el grupo A (PGR) y grupo control A	61

ÍNDICE DE FIGURAS

N	Título	Págs
1	Representación esquemática de la coagulación	15
2	Vía de la Proteína C 16	16
3	Mecanismos inhibidores de la antitrombina	17
4	Esquema de la trombofilia como ejemplo de la enfermedad compleja	18
5	Representación esquemática del procesamiento proteolítico del Factor V	27
6	Representación esquemática del efecto protrombótico del Factor V Leiden en la coagulación el sistema fibrinolítico y el sistema anticoagulante de la PC	28
7	Estructura del gen de la protrombina humana y localización de la mutación 20210 G por A	30
8	Metabolismo de la homocisteína	32
9	Ciclos de Amplificación utilizados en la PCR	50
10	Diagrama del tamaño en pares de bases y la ubicación de los productos de PCR esperados utilizando el reactivo de la prueba de trombosis	52
11	Fórmulas utilizadas para calcular la frecuencia genotípica	53
12	Formulas utilizadas para calcular la frecuencia alélica (prevalencia de la mutación)	53
13	Numero de pacientes en el grupo A (PGR) según la edad.	57

14	Numero de pacientes en el grupo B (Trombosis) segun la edad	57
15	Porcentaje de pacientes en el grupo B (Trombosis) segun Sexo	58
16	Numero de pacientes en el grupo Control B segun la edad	58
17	Porcentaje de individuos en el grupo Control B segun Sexo	59
18	Prevalencia de la mutacion en el Factor V G1691A Factor II G20210A y MTHFR C677T en el grupo de pacientes con PGR y Control	62
19	Prevalencia de la mutación en el Factor V G1691A Factor II G20210A y MTHFR C677T en el grupo B (Trombosis) y grupo control B	62
20	Frecuencia genotipica del Factor V G1691A Factor II G20210A y MTHFR C677T en el grupo de pacientes con Trombosis y Control	63
21	Frecuencia genotipica del Factor V G1691A Factor II G20210A y MTHFR C677T en el grupo de pacientes PGR y Control	64
22	Electroforesis en Gel de agarosa 2% de pacientes a los cuales se les realizo la prueba de trombofilia	83
23	Interpretación de la Electroforesis de un gel de agarosa 2% para la prueba de trombofilia presentado en el Anexo I	84

ABREVIATURAS UTILIZADAS

CHDr A A M Complejo Hospitalario Doctor Arnulfo Arias Madrid

PGR Pérdida Gestacional Recurrente

MTHFR Metilentetrahidrofolato Reductasa

DCL Deficiencia de cuerpo luteo

ACA Anticuerpos anticardiolipinas

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

ARMS Sistema de mutaciones refractarias a la amplificación

FV factor V

FVL factor V Leiden

FT factor tisular

PK precalicreína

HKO o HMWK quininógeno de alto peso molecular

GLA γ carboxiglutamato

PA fosfatidil serina

PI fosfatidil inositol

LACI inhibidor de la coagulación asociado a lipoproteína

EPI inhibidor de la vía intrínseca

TFPI factor tisular inhibidor

AT antitrombina

CH II cofactor de la heparina II

TFPI 1 inhibidor de la vía del factor tisular

α 1AT α 1 antitripsina

TM trombomodulina

PC proteína C

EPCR receptor endotelial de la proteína C

PCI inhibidor de la proteína C activada

PCA proteína C activada

PT Protrombina

TRP Prueba de riesgo de trombosis

RESUMEN

Prevalencia de la mutación en el Factor V (G1691A) Factor II (G20210A) y la Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR C677T) en pacientes con riesgo de trombofilia y población sana de Panamá

La trombosis es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en el mundo con frecuencias de 1 por 100000 personas durante la infancia y de 1 por 100 personas en los adultos mayores con evidencia de la alta prevalencia de genes mutados que aumentan la susceptibilidad. Entre ellos se encuentran el Factor V de Leiden (FVL) la mutación de la protrombina G20210A y el polimorfismo C677T de la enzima Metilentetrahidrofolato reductasa. Se seleccionaron 105 pacientes con historia de un evento tromboembólico y se compararon con 105 individuos sin historia de trombosis. También analizamos 55 mujeres con historia de pérdida gestacional recurrente (PGR) y comparamos con 55 mujeres sin historia de PGR o trombosis. Se encontró heterocigocidad para el Factor V de Leyden en el 6.7% de los pacientes con historial de trombosis y en el 1.0% de los controles con un Odds Ratio (OR) de 7.43 (IC95% 0.89 a 61.48) por lo que asociamos esta mutación como causa de trombosis. Encontramos un riesgo de 2 veces (OR 2.58 IC95% 0.48 a 13.58) de presentar trombosis en los pacientes con la mutación del Factor II G20210A. No encontramos la mutación del FVL y Factor II G20210A en las mujeres con pérdida gestacional recurrente por lo que no asociamos estas mutaciones como causa de la pérdida. No encontramos asociación del polimorfismo C677T de la MTHFR como causa de trombosis o PGR en los pacientes estudiados.

Palabras claves: trombosis, Factor V de Leyden, protrombina G20210A, metilentetrahidrofolato reductasa.

ABSTRACT

Prevalence of the mutation in the Factor V (G1691A) Factor II (G20210A) and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR C677T) in patients at risk of thrombophilia and healthy population of Panama

Thrombosis is a major cause of mortality and morbidity worldwide with frequencies of 1 per 100 000 people in childhood and 1 in 100 people in older adults with evidence of the high prevalence of mutated genes that increase susceptibility. These include the Factor V Leiden (FVL) the prothrombin G20210A mutation C677T polymorphism and Methylenetetrahydrofolate reductase enzyme. 105 patients were selected on the history of a thromboembolic event and compared with 105 individuals with no history of thrombosis. We also analyzed 55 women with a history of recurrent pregnancy loss (PGR) and compared with 55 women with no history of thrombosis or PGR. Heterozygosity for Factor V Leiden was found in 6.7% of patients with a history of thrombosis and 1.0% of controls with an odds ratio (OR) of 7.43 (95% CI 0.89 to 61.48) so associate this mutation as a cause of thrombosis. We found a watering 2 times (OR 2.58 95% CI 0.48 to 13.58) of having thrombosis in patients with Factor II G20210A mutation. We found no mutation of the Factor II G20210A and FVL in women with recurrent pregnancy loss so no ascriamos these mutations as a cause of loss. We found no association of MTHFR C677T polymorphism as a cause of thrombosis or PGR in the patients studied.

Keywords thrombosis Factor V Leiden prothrombin G20210A methylenetetrahydrofolate reductase

INTRODUCCION

El término Estados de Hipercoagulabilidad se refiere a una amplia serie de condiciones tanto hereditarias como adquiridas de las que se sabe o sospecha que están asociadas con hiperactividad del sistema de coagulación y/o con el desarrollo de eventos tromboembólicos. En esta condición se incluyen cambios transitorios o permanentes de la coagulación relacionados con defectos genéticos definidos o con la interacción con el ambiente así como determinadas condiciones adquiridas que predisponen a la trombosis (Bertina *et al* 1997)

Se conoce como Trombofilia a la tendencia del individuo a la trombosis (Martinuzzo *et al* 1999). La trombosis es la obstrucción local del flujo de sangre por una masa en algún vaso arterial o venoso que produce la isquemia de los tejidos irrigados por este vaso (Kumar *et al* 2008)

La Trombofilia trata de un conjunto de alteraciones heterogéneas en el que se pueden distinguir dos categorías fundamentales. **Trombofilias hereditarias** en donde el trastorno clínico parece tener una base genética en el cual hay un estado de hipercoagulabilidad primario y **trombofilia adquirida** que está constituida por estados de hipercoagulabilidad asociada a circunstancias clínico patológicas que condicionan un

mayor riesgo trombótico en el individuo (Leme *et al* 1996 Makris *et al* 1997 Bauer *et al* 1998 Rao *et al* 1998)

La trombosis es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en el mundo y su frecuencia es de 1 por 100000 personas durante la infancia y de 1 por 100 personas en los adultos mayores lo cual demuestra la alta prevalencia de genes mutados que aumentan la susceptibilidad (Seligsohn y Lubetsky 2001) Se calcula que la trombosis venosa causa unas 50 000 muertes anuales en Estados Unidos con una incidencia anual del 1 por 1000 (Heit *et al* 2001)

Se han documentado muchos factores de riesgo que fomentan la trombosis tales como las intervenciones quirúrgicas el embarazo los anticonceptivos orales y la inmovilización prolongada (síndrome de la clase turista) (Rosendaal 1999)

El delicado equilibrio del proceso de coagulación de la sangre también se ve influido por un elemento genético La vía bioquímica de la coagulación es compleja y contiene muchos factores que potencian o inhiben el proceso provocando una coagulación insuficiente (hemofilia) o excesiva (trombofilia) Se han identificado tres factores como los principales responsables de la mayoría de los casos de trombofilia hereditaria (Bertina y Rosendaal 1998 Poort *et al* 1996 Press *et al* 2002) Las mutaciones en los genes de estos factores son indicadores útiles de un mayor riesgo de trombosis venosa Estos son el factor V Leiden (R506Q) el factor II (protrombina 20210A) y la MTHFR (677C>T) La MTHFR (metilentetrahidrofolato reductasa) es esencial para el mantenimiento de las concentraciones de los aminoácidos homocisteína, los cuales que influyen en el proceso de coagulación de la sangre

El desequilibrio entre los sistemas procoagulantes y sus mecanismos regulatorios causado por la interacción entre factores genéticos y adquiridos es un paradigma multifactorial en el cual estos interactúan de manera cooperativa y conllevan a un riesgo significativo para el desarrollo de trombosis (Miller 2007)

El sistema hemostático interviene de forma relevante durante el proceso reproductor. Durante la gestación normal se produce un estado de hipercoagulabilidad fisiológica (Gilabert *et al* 1997)

La pérdida gestacional recurrente (PGR) de 2 o más embarazos consecutivos es causada por diferentes enfermedades bien conocidas y otras en estudio. 7% se debe a anomalías cromosómicas, 10% a anomalías anatómicas, 15% son de causa hormonal (estrógenos, progesterona, diabetes, hormona tiroidea) y un 53-62% se debe a anomalías en la hemostasis (Sturatt y Lancet 1990)

En la población general la PGR ocurre en un 2% de mujeres en edad reproductiva, mientras que en mujeres con trombofilia conocida previamente al embarazo, menos de un 25% llegan a tener un embarazo a término con feto vivo (Pons *et al* 2002)

Cada vez se aportan más evidencias que las pacientes con pérdidas recurrentes de embarazo y trombofilia, son beneficiadas con el tratamiento y el seguimiento multidisciplinario para poder culminar su embarazo en forma satisfactoria con un recién nacido vivo y sano (Kupferminc *et al* 1999, Otero *et al* 2001). De ahí que el reconocimiento de factores de riesgo ya establecidos y conocidos como las trombofilias heredadas deben determinarse para establecer el potencial patológico en cada individuo ya que de esto depende su tratamiento, seguimiento, prevención y estudios familiares.

El tromboembolismo venoso es el tercer desorden cardiovascular más prevalente después de la enfermedad isquémica y del choque pudiendo desencadenar un embolismo pulmonar evento que amenaza la vida. Más aun los eventos tromboticos agudos generan un aumento en la morbilidad de los pacientes cuando estos presentan síndromes posttrombóticos o enfermedad recurrente (Torres *et al* 2006)

En Estados Unidos se ha estimado que aproximadamente dos millones de habitantes presentan algún episodio de tromboembolismo venoso al año y 600 000 de ellos hacen embolismo pulmonar (López *et al* 2004). A pesar de esta enorme cantidad de población afectada por la trombosis se sabe poco sobre su real patogénesis dado el carácter multifactorial que la caracteriza. Sin embargo en los últimos 20 años se ha visto un incremento en el estudio de los factores hereditarios también llamados trombofilias detección que facilitaría a los clínicos decidir sobre la instauración de terapias de anti coagulación duración del tratamiento y estudios de extensión a otros miembros de la familia (Seligsohn y Lubetsky 2001)

Particularmente llaman la atención el estudio del Factor V de Leiden y Protrombina G20210A por ser las más frecuentes y el que presenta mayor riesgo. En los últimos años la hiperhomocisteinemia también se ha tenido en cuenta como factor de riesgo no sólo para trombosis venosa sino para otras alteraciones como defectos del tubo neural. En particular se estudian los polimorfismos de la enzima Metilentetrahidrofolato reductasa C677T y A1298C los cuales han mostrado un leve incremento del riesgo (Seligsohn y Lubetsky 2001)

El factor V Leiden es la forma heredada más frecuente de la trombofilia. Las poblaciones generales de Estados Unidos y Europa presentan porcentajes de entre el 3 y el 8% de heterocigosidad en el factor V Leiden (Zoller *et al* 1997).

La frecuencia de la homocigosidad en la mutación del factor V Leiden es de aproximadamente 1 entre 5000, aunque la prevalencia varía considerablemente de una población a otra. El riesgo de una tromboembolia venosa depende de factores tanto genéticos como adquiridos tales como la edad, obesidad, el embarazo, los anticonceptivos orales, inmovilidad prolongada, ciurgias ortopédicas, terapia de remplazo hormonal, entre otros. La edad es un factor importante; el aumento del riesgo con la edad es más rápido en individuos con una mutación del factor V Leiden. Un heterocigótico individual para la mutación del factor V Leiden tiene 7 veces más probabilidades de presentar tromboembolia venosa; un homocigótico individual para el factor V Leiden tiene un riesgo 80 (ochenta) veces mayor (Makris *et al* 1997).

Otros factores de riesgo genéticos (protrombina 20210A y MTHFR 677C) también contribuyen a aumentar el riesgo de allí que un heterocigótico para el factor V Leiden tiene 20 veces más riesgo si también es heterocigótico para la 20210A (Endler y Mannhalter 2003).

Por lo general, las pruebas están dirigidas a pacientes de menos de 50 años con trombosis venosa y a pacientes o familiares con antecedentes familiares de trastornos trombolíticos. También es conveniente realizar las pruebas a los familiares de individuos que tengan factor V Leiden y a las mujeres que presenten pérdida fetal recurrente, preeclampsia grave o muerte fetal. El conocimiento del estado del factor V Leiden puede

influir en el tratamiento de un embarazo o en el proceso de toma de decisiones sobre anticonceptivos orales (Bokarewa *et al* 1996)

Una vez identificado el factor V Leiden la comprobación de otros factores de riesgo de trombosis como la protrombina (factor II) y la MTHFR puede aportar información valiosa. La ventaja de la identificación de mutaciones del factor V Leiden en pacientes con trombosis venosa consiste en que los miembros asintomáticos de sus familias pueden optar por determinar si ellos también tienen un mayor riesgo y así facilitar el establecimiento de su tratamiento antitrombótico durante periodos de mayor riesgo como durante intervenciones quirúrgicas, embarazos, toma de anticonceptivos orales o largos periodos de inmovilización como viajes largos en avión (Spector *et al* 2005)

La combinación de defectos trombofílicos aumenta el riesgo de pérdida fetal como lo demostró el estudio European Prospective Cohort on Thrombophilia (EPCOT) (Preston *et al* 1996)

En Panamá, en el año 2010 estudiantes de tesis de Tecnología Médica de la Universidad de Panamá realizaron un primer estudio descriptivo retrospectivo en pacientes con pérdida gestacional recurrente que ingresaron al Laboratorio de Genética del Complejo Hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid, entre los años 2007-2010. En dicho estudio determinamos la prevalencia de las mutaciones antes descritas: Factor II (G20210A) 1.08%, Factor V Leiden 1.52% y MTHFR (C677T) 38.89% (Samaniego *et al* 2010)

Debido a la alta prevalencia de la mutación C677T en la MTHFR encontrada en el primer estudio de mujeres con PGR nos propusimos realizar este proyecto con el objetivo de conocer la prevalencia de esta mutación incluyendo la del Factor V leyden y el Factor II (G20210A) en pacientes sin historia de trombois o PGR y de esta forma mediante estudio de casos y controles determinar la asociacion de estas mutaciones como causa de PGR o trombosis en nuestra poblacion

OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

Objetivo General

Comparar la prevalencia de la mutación en el Factor V (G1691A) Factor II (G20210A) y la Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR C677T) en pacientes con riesgo de trombofilia y población sana de Panamá

Objetivos específicos

- Determinar la prevalencia de la mutación G1691A en el gen del factor V
- Determinar la prevalencia de la mutación G20210A en el gen de la Protrombina
- Determinar la prevalencia de la mutación C677T en el gen de la enzima MTHFR
- Comparar la frecuencia de estas mutaciones en individuos sanos pacientes con Pérdida Gestacional Recurrente y pacientes con trombosis

CAPITULO I
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

1 FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

1.1 GENERALIDADES

La definición clínica de trombosis es la presencia patológica de un tapón hemostático en un vaso sanguíneo o en el corazón que causa obstrucción del flujo sanguíneo a través del Sistema Circulatorio. Dependiendo de su localización la enfermedad trombotica puede ser venosa o arterial, siendo sus factores de riesgos y fisiopatología diferentes para cada una (Segers *et al* 2007).

Además es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad, generando una incidencia de 100 a 192 casos por 100000 personas/año. De estos, un tercio presentan un émbolo pulmonar sintomático y los demás permanecen con una trombosis venosa profunda (Sturatt *et al* 1990, Pons *et al* 2002).

En 1884 Virchow postuló la teoría de una tríada de anomalías (lesión endotelial, estasis e hipercoagulabilidad) para explicar la etiología de la trombosis. Este concepto resultó profético, dado que ahora se ha demostrado que los tres componentes de la tríada juegan un rol activo en el desarrollo de los fenómenos tromboticos. En los últimos años ha sido evidente que el riesgo de desarrollar la enfermedad es un proceso dinámico que resulta del sinergismo entre factores de riesgo adquiridos y trombofilias heredadas.

Para poder entender cómo estos factores alteran el mecanismo de la formación del trombo es necesario entender la fisiología normal de la hemostasis los mecanismos que la regulan y los agentes de diversas índoles que aumentan el riesgo (Franchini *et al* 2006)

1.2 HEMOSTASIS Y REGULACIÓN DE LA COAGULACIÓN

La hemostasis es un mecanismo fisiológico que controla la fluidez de la sangre y tiene el potencial de inducir rápidamente la formación de un tapón en los sitios de dano con el objetivo de parar o disminuir el sangrado. Este proceso se realiza en tres diferentes fases. La primera de ellas inicia con la adhesión de las plaquetas a las fibras de colágeno subyacentes al endotelio vascular que han sido expuestas como consecuencia del dano. Esta adhesión es mediada por las glicoproteínas Ia/IIa y el factor de Von Willebrand (FvW) y como resultado las plaquetas empiezan a liberar diferentes factores de coagulación y de activación de leucocitos. Posteriormente se adhieren una a otra a través de integrinas lo cual termina formando el tapón hemostático plaquetario. Este proceso también denominado hemostasis primaria (López *et al* 2004 Segers *et al* 2007 Nemerson *et al* 1982)

El proceso de coagulación como tal también llamado hemostasis secundaria inicia con la exposición del factor tisular a la sangre a partir de las capas subendoteliales y con gran afinidad y especificidad por las formas zimógena y activa del factor VII. Una vez unido

al factor tisular activa a los factores IX y X. El IX a su vez interactúa con su cofactor no enzimático el Factor VIII en la superficie de la plaqueta para formar el complejo 'tenase' el cual activa eficientemente al factor X. Éste se ensambla en la membrana plaquetaria con el Factor Va y forma el complejo de la protrombinasa el cual es el encargado de transformar la protrombina a trombina y ella a su vez convierte el fibrinógeno soluble a fibras de fibrina insolubles que se agregan al coágulo de fibrina suave (López *et al* 2004 Segers *et al* 2007 Nemerson *et al* 1982)

La última parte de la hemostasis involucra la fibrinólisis. Su rol es remover los depósitos de fibrina después de que el vaso lesionado ha sido restaurado a través de la plasmina (forma activa del plasminógeno) de tal manera que la red de fibrina es disuelta (Figura 1) (Lopez *et al* 2004 Segers *et al* 2007 Nemerson *et al* 1982)

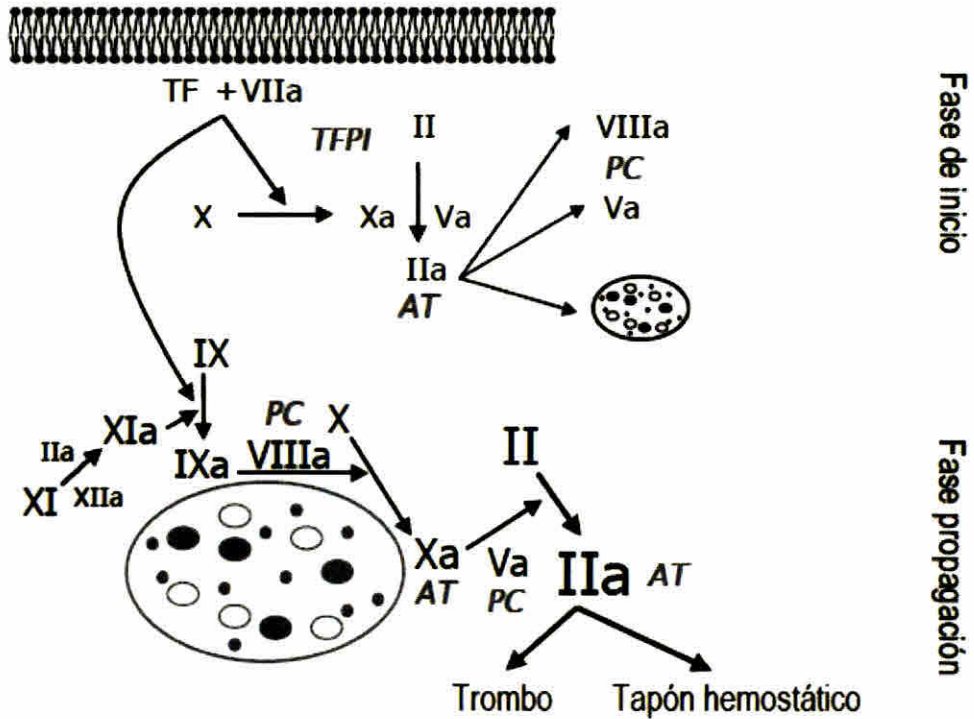


Figura 1. Representación esquemática de la coagulación. En la fase inicial el factor tisular (TF) que, en condiciones normales, no está en contacto con la sangre, se expone a ella y tras unirse al factor VIIa, inicia la vía extrínseca (su inhibidor es TFPI). Se genera una cantidad de trombina IIa, suficiente para activar las plaquetas, y los factores VIII y V (fase inicial). Casi simultáneamente se activa el factor IX, que junto con el factor VIIIa genera Xa. Este, con el Va como cofactor, genera trombina (IIa) en grandes cantidades (fase de propagación). Esta fase es inhibida fundamentalmente por la antitrombina (AT) y por la vía de la proteína C (PC). Tomado de (Mateo, J. 2001).

La formación del coágulo es bastante rápida, sin embargo el peligro radica en que el exceso del proceso termine produciendo una trombosis. Por ello la naturaleza ha creado varios mecanismos anticoagulantes para controlar las vías en diferentes niveles, dentro de los cuales se destaca el sistema de los inhibidores de proteasas séricas plasmáticas (antitrombina, alfa 2 macroglobulina y antitripsina) y la vía de la proteína C. Éste último

es considerado el mayor sistema anticoagulante en vivo. Inicia con la presencia de un exceso de trombina no unida al coágulo que rápidamente se une a una glicoproteína transmembranal del epitelio llamada trombomodulina. Una vez unida, su capacidad pro coagulante es transformada a propiedades anticoagulantes al ser la encargada de activar a la Proteína C. Es así, que la Proteína C activada (APC) se une a un cofactor, la Proteína S en la superficie fosfolipídica de las plaquetas y rápidamente inactiva al factor Va y al FVIIIa, y de esta manera disminuyen la generación de trombina en la vía pro coagulante (figura 2) (Miller *et al.*, 2007; Segers *et al.*, 2007).

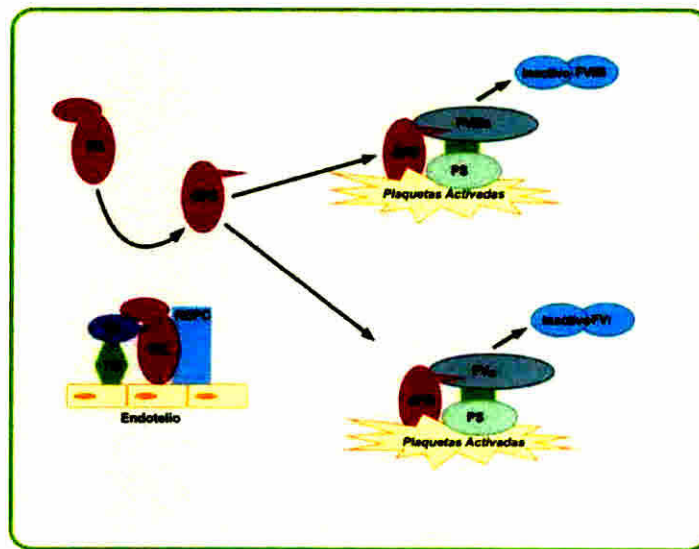


Figura 2. Vía de la Proteína C.

ACP=Proteína C activada; TM=trombomodulina; Thr=trombina; REPC=receptor endotelial de la proteína C; FVa = factor V activado; FVIIIa = factor VIII activado; S=Proteína S. Adaptado de McPherson & Pincus: Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 21st ed.

La antitrombina (formalmente llamada antitrombina III) es una proteína inhibidora circulante del plasma que regula a la trombina y al factor Xa y en menor proporción a los

factores IXa, XIa, XIIa y VIIa. Su función se ve incrementada en las células endoteliales por glicosaminaglicanos tales como el heparán sulfato, dermatán sulfato y farmacológicamente por la heparina (Figura 3) (Miller *et al.*, 2007).

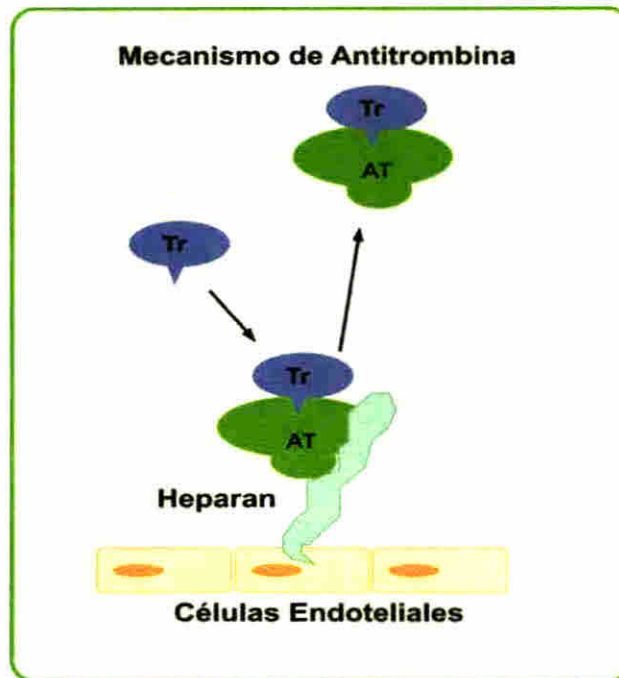


Figura 3. Mecanismos inhibidores de la antitrombina.

AT=antitrombina; Heparan= Heparina; AT= antitrombina; Thr= trombina.

Tomado de McPherson & Pincus: Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 21st ed. 17

1.3 FACTORES DE RIESGO

El tromboembolismo venoso a menudo resulta de las interacciones entre varios factores de riesgo, y el entendimiento de ellos incrementa la posibilidad de diagnóstico para realizar un tratamiento oportuno. La triada de Virchow mencionada anteriormente (estasis, hipercoagulabilidad y disfunción endotelial) promueve la trombogénesis

conociéndose ciertos factores de riesgo que pueden ser de tipo heredado y adquirido y se mencionarán a continuación (Osinbowale *et al.*, 2010).

El término trombofilia hereditaria, reconoce la presencia de factores hereditarios, que por si solos predisponen a la trombosis pero que, debido a la naturaleza episódica de la trombosis, requieren interacción con otros componentes (hereditarios o adquiridos) antes de la presentación clínica de la enfermedad (ver figura 4) (Mateo, J. 2001).

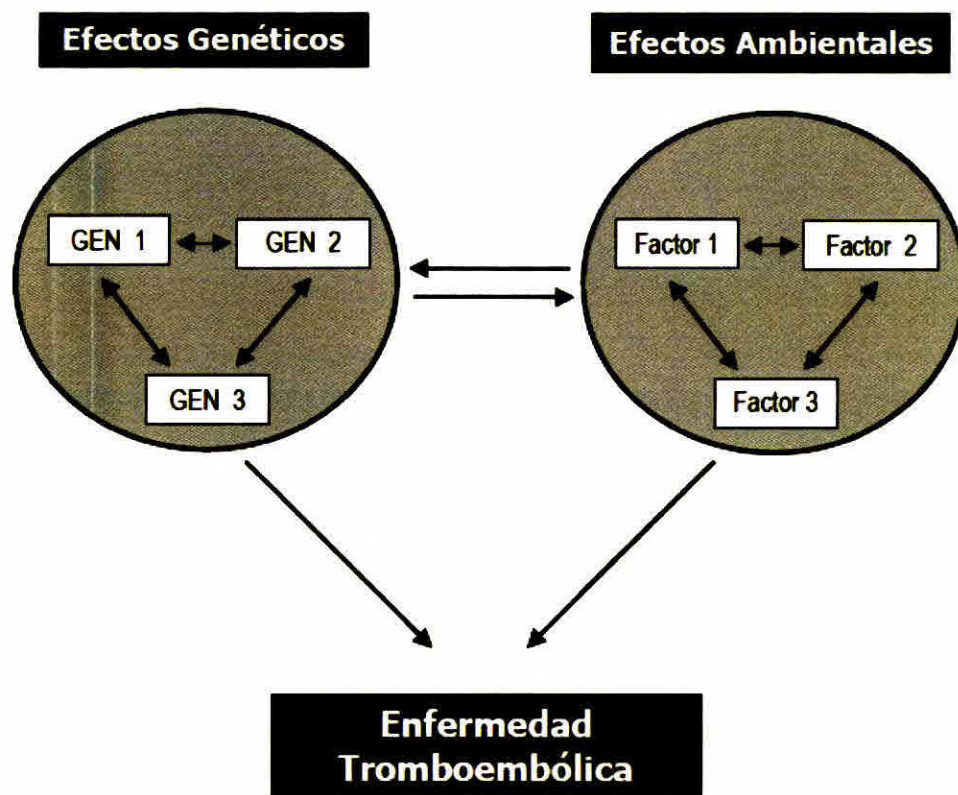


Figura 4. Esquema de la trombofilia como ejemplo de la enfermedad compleja. La interacción de diversos genes entre sí, de factores ambientales entre sí, condicionan el fenotipo, en este caso, la enfermedad tromboembólica. Tomado de (Mateo, J. 2001).

1.3 1 FACTORES DE RIESGO ADQUIRIDOS

1.3 1 1 Cirugía Ortopédica mayor (Reemplazo de cadera o rodilla)

Estudios clínicos aleatorizados han demostrado tasas de trombosis 7 a 14 días después de una cirugía ortopédica mayor en pacientes sin profilaxis hasta de un 60%. También se identificaron signos de embolismo pulmonar hasta en un 28% cuando se realizó una escanografía de ventilación perfusión de rutina (Osinbowale *et al* 2010)

1.3 1 2 Fractura de pelvis cadera o huesos largos

Los estudios en pacientes con fractura de cadera fueron de los primeros en demostrar la magnitud del riesgo de presentar trombosis venosa. En ocho estudios prospectivos en los cuales se realizó venografía de contraste después de una cirugía por fractura de cadera se encontró aproximadamente un 50% de trombosis venosa profunda en pacientes sin profilaxis (Osinbowale *et al* 2010)

1.3 1.3 Cirugía general mayor

Este término se aplica a pacientes que van a cirugía abdominal o torácica y que requieren anestesia general por lo menos de 30 minutos. Sin trombofilaxis la incidencia de trombosis fue de aproximadamente 10%-40% entre los pacientes (Osinbowale *et al* 2010)

1.3.1.4 Trauma múltiple y daño a la médula espinal

Se encontraron estudios que reportan trombosis venosa profunda en el 47% de pacientes con trauma (Geerts *et al* 1994)

1.3.1.5 Quimioterapia y malignidad

El cáncer activo fue un factor de riesgo para el 22.3% de personas en un estudio poblacional. La frecuencia de trombosis se incrementó de 2 a 3 veces en pacientes que iban a cirugía por alguna patología tumoral maligna en comparación a aquellos que iban por otro tipo de patología. La administración de quimioterapia también se ha asociado a un incremento del riesgo. Por ejemplo, mujeres con carcinoma de mama con quimioterapia y cirugía tienen un riesgo aumentado en 3 veces de presentar un evento trombotico en comparación a mujeres cuyo tratamiento es solamente quirúrgico (Osinbowale *et al* 2010)

1.3.1.6 Cirugía de rodilla artroscópica

Estos pacientes presentan un riesgo bajo a moderado dependiendo de la presencia de riesgos adicionales. Cambios adversos en la hemostasis después de una laparoscopia también han sido reportados (Osinbowale *et al* 2010)

1.3.1.7 Anticonceptivos orales y embarazo

Un estudio de casos y controles concluyó que la incidencia de trombosis venosa profunda en mujeres jóvenes sin enfermedad que toman anticonceptivos estrogénicos orales es de 1 a 3 por 10000 personas año. El embarazo aumenta este riesgo 5 veces. El embolismo pulmonar es una de las principales causas de mortalidad materna postparto con una incidencia de 1 caso por cada 1000 nacimientos (Osinbowale *et al* 2010).

1.3.1.8 Terapia de Reemplazo Hormonal

Mujeres recibiendo terapia de reemplazo hormonal tienen un aumento del riesgo de 2 a 4 veces de trombosis venosa idiopática en comparación a mujeres sin el tratamiento. En hombres con terapia hormonal para carcinoma de próstata también se ha reportado un aumento del riesgo (Osinbowale *et al* 2010).

1.3.1.9 Tromboembolismo venoso previo

Pacientes con un episodio previo de trombosis venosa profunda tienen un riesgo mayor para recurrencia, particularmente cuando están expuestos a condiciones de alto riesgo (cirugías mayores, inmovilidad prolongada). En un estudio de casos y controles, pacientes con un episodio previo tenían un Odds Ratio de 15.6 en comparación a aquellos que no lo tenían (Osinbowale *et al* 2010).

1.3.1.10 Inmovilidad prolongada debido a viajes en carro o avión

Reportes de casos sugieren que la mayoría de estos eventos afectan a personas con otros factores adyuvantes o con un episodio previo de tromboembolismo venoso (Osinbowale *et al* 2010)

1.3.1.11 Venas várices

La importancia de las venas várices como factor de riesgo independiente es controversial. En general se piensa que es un factor débil para presentar la patología (Osinbowale *et al* 2010)

1.3.1.12 Edad

Pacientes mayores de 40 años presentan un riesgo significativo aumentado en comparación a pacientes jóvenes y este riesgo se dobla por cada década subsecuente (Osinbowale *et al* 2010)

1.3.1.13 Obesidad

Un estudio de casos y controles en 1272 pacientes mostró que la obesidad presentaba un odds ratio de 2.39 y un riesgo relativo de 1.7% a 3.2% (Osinbowale *et al* 2010)

1.3 2 FACTORES DE RIESGO HEREDITARIOS

La resistencia a la proteína C activada (APC) protrombina G20210A deficiencia de antitrombina, proteína C y S homocistinuria, hiperhomocisteinemia y el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos constituyen la mayoría de las trombofilias heredadas Su descubrimiento clasificación y diagnóstico han sido un reto para la medicina en los últimos años desde el descubrimiento de la primera mutación asociada a trombosis en el año de 1965 (Osinbowale *et al* 2010)

1 4 DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LAS TROMBOFILIAS

En los últimos años se ha vuelto evidente que la generación de la trombosis implica un proceso dinámico que resulta de la actividad conjunta de los riesgos antes mencionados con las trombofilias heredadas (Seligsohn *et al* 2001 Franchini *et al* 2006)

La deficiencia de antitrombina y la disfibrinogenemia fueron las primeras trombofilias en ser descritas encontrándose en familias en donde varios miembros presentaban trombosis venosa Posteriormente deficiencias heterocigotas de la Proteína C y S fueron identificados también como causa de trombofilia heredada Inicialmente la búsqueda de pacientes con trombosis idiopáticas y alteraciones genéticas fue algo decepcionante porque sólo el 5% de los pacientes las presentaban La situación cambió dramáticamente en el año de 1993 tras el descubrimiento de la resistencia a la Proteína C

activada En 1996 se encontró que la sustitución de adenina por guanina en el nucleótido 20210 del gen de la protrombina (G202120A) era otra causa de trombofilia Recientemente los estudios se han enfocado en el efecto de la hiperhomocisteinemia como factor de riesgo tanto heredado como adquirido para el desarrollo de trombosis venosa profunda (Seligsohn *et al* 2001)

El termino 'Trombofilia Hereditaria' fue inicialmente usado para describir la deficiencia congénita de antitrombina sin embargo ahora se usa genericamente para todos los desórdenes de hipercoagulabilidad causados por un defecto hereditario De esta manera se ha propuesto clasificarlas en cinco grandes grupos (Franchini *et al* 2006)

Defectos cuantitativos o cualitativos de factores inhibidores de la coagulación antitrombina, proteína C, proteína S, heparina, cofactor II y deficiencias de trombomodulina

1 Aumento en los niveles o ganancia de función de los factores de coagulación factor V de Leiden, mutación de la protrombina, hiperfibrinogenemia y elevación en los niveles de los factores VII, VIII, IX y XI

2 Hiperhomocisteinemia, polimorfismos de la enzima Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)

3 Defectos en el sistema fibrinolítico: plasminógeno activador del plasminógeno tisular, factor XIII y lipoproteína

4 Alteraciones en la función plaquetaria

Entre todos los factores congénitos se hace especial énfasis en tres de ellos: la mutación R506Q del gen del factor V de la coagulación (conocido como factor V de

Leiden) y la mutación G20210A del gen de la protrombina, que se han revelado de especial importancia porque se encuentran con más frecuencia en los pacientes con episodios de Trombosis Venosa Profunda (TVP) su prevalencia en la población general (poblacion occidental) es bastante alta y además al ser factores hereditarios el estudio familiar de pacientes portadores puede ser util como herramienta de prevención (Carmona *et al* 2003)

Por otro lado estudiar la asociación entre algunas variantes genéticas (polimorfismos de la enzima Metilentetrahidrofolato reductasa MTHFR) asociadas a niveles elevados de homocistena y trombosis venosa puede ser informativa para dilucidar si en verdad los niveles altos de ésta juegan un rol crucial en el desarrollo de la patologia (Franchini *et al* 2006)

1 4 1 Factor V de Leiden

El factor V de la coagulación es una proteina esencial en la hemostasis jugando un rol crucial tanto en la via procoagulante como anticoagulante En su forma inactiva sirve como un cofactor del Factor X activado (FXa) en el complejo de la protrombinasa el cual cataliza la conversion de protrombina en trombina sin embargo también actua como cofactor de la proteina C activada (APC) en la regulación de la actividad del Factor VIII activo (Franchini *et al* 2006)

El gen que codifica el factor V es de aproximadamente 80 kilobases de tamaño y se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 1 (1q23) y consiste de 25 exones y

24 intrones Su transcripción da origen a un mRNA maduro de 6 8 kb el cual codifica una proteína de 330 kDa que circula en la sangre en una concentración de aproximadamente 21nM (Segers *et al* 2007)

Antes de 1993 la evaluación de las trombofilias heredadas se limitaba a realizar ensayos funcionales para la proteína C S o deficiencia de antitrombina esta aproximación cambio cuando se describió una nueva forma familiar de trombofilia caracterizada por resistencia a la Proteína C activada (Dahlback *et al* 1993) Subsecuentemente varios laboratorios reportaron el defecto genético responsable de esta resistencia una mutación sin sentido (Guanina por Adenina) en el nucleótido 1691 del gen del Factor V El cambio en el aminoácido resultante Arginina por Glutamina en la posición 506 ocurre precisamente en uno de los tres sitios donde la APC normalmente cliva e inactiva la forma procoagulante del Factor Va, haciendose por tanto parcialmente resistente a la acción anticoagulante de la APC y es inactivado aproximadamente a una velocidad diez veces menor de lo normal resultando en un aumento de la trombina circulante y por tanto a un estado protrombótico (figura 5 y 6) (Carmona *et al* 2003)

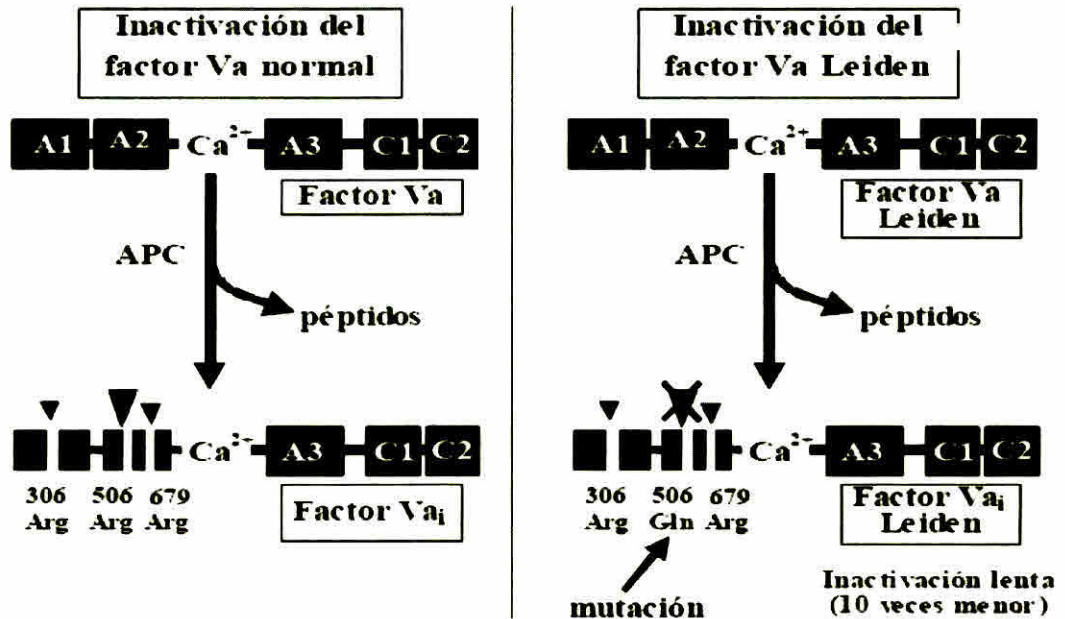


Figura 5. Representación esquemática del procesamiento proteolítico del Factor V. El Factor V es una larga glicoproteína de cadena sencilla, organizada en los siguientes dominios: A1-A2-B-A3-C1-C2. La activación del Factor Va se lleva a cabo vía proteólisis por la trombina o el factor Xa. El factor Va se compone de una cadena pesada (dominios A1 y A2) y una cadena ligera (dominios A3, C1 y C2). Durante el proceso de inactivación, la proteína C activada (PCA) escinde al factor Va en las Arg506, Arg306 y Arg697. La mutación puntual G por A en el nucleótido 1691 en el gen del factor V, origina el cambio de la arginina (R) 506 por glutamina (Q). Esta sustitución disminuye notablemente el proceso de inactivación del factor Va mediado por PCA en este sitio de ruptura, constituyendo la base molecular de la resistencia a la PCA (RPCA), tomado de (Acuña, M. 2009).

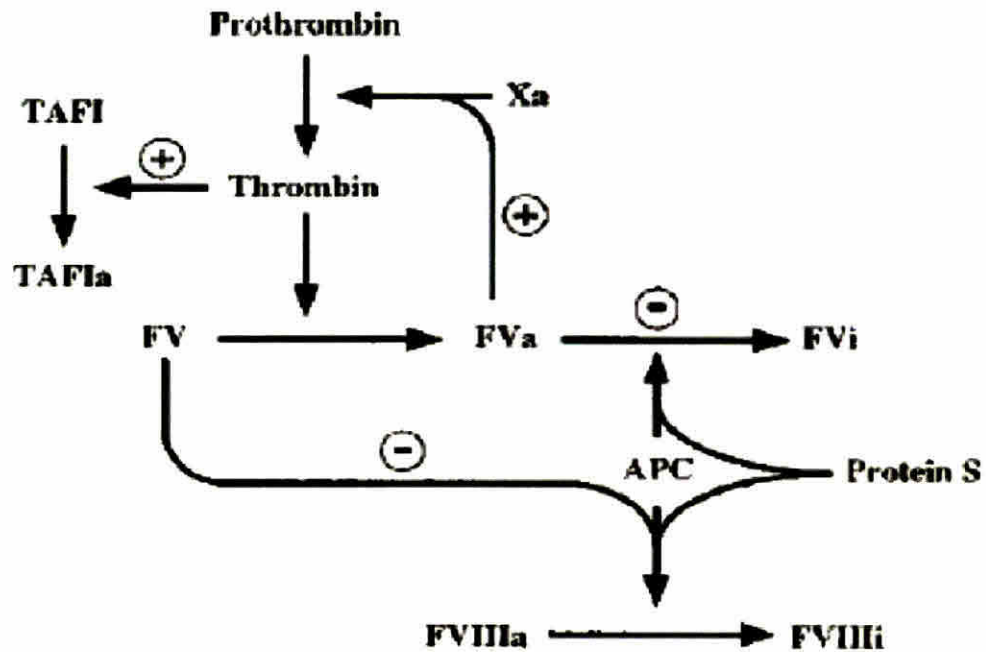


Figura 6. Representación esquemática del efecto protrombótico del Factor V Leiden en la coagulación, el sistema fibrinolítico y el sistema anticuagulante de la PC. El FVL conduce a una disminución en la inactivación del FVa y por ende, a un incremento en la actividad del mismo, lo cual conduce a un aumento en la producción de trombina, lo que a su vez provoca un aumento en la formación del trombo. El incremento de trombina también induce el aumento en la generación de TAFI (un inhibidor del sistema fibrinolítico). Además, el FVL también afecta la actividad anticuagulante en el sistema de la proteína C, pues es un pobre cofactor en degradación del FVIIIa mediada por la APC. Tomado de (Zoller, *et al.*, 1999).

Esta alteración en su forma heterocigota genera un aumento del riesgo de presentar un episodio de trombosis venosa de 3 a 7 veces, mientras que para los homocigotos aumenta de 50 a 100 veces (Press *et al.*, 2002; Rossendorf *et al.*, 2007; Segal *et al.*, 2009).

En 1998 se descubrieron otras dos mutaciones en el factor V: el FV Hong Kong y el FV de Cambridge los cuales fueron reportados en pacientes con trombosis. Ambas mutaciones son resultado del remplazo de la Arginina 306, en el FV de Hong Kong por

una glicina y en el de Cambridge por treonina Sin embargo el primero no ha sido asociado a resistencia contra APC (Norstrem *et al* 2002)

1 4 2 Mutaciones en la Protrombina

Unos meses despues del descubrimiento del Factor V de Leiden otro importante factor de riesgo protrombótico fue identificado De hecho hacia finales de 1996 un estudio mostró que 18% de los pacientes seleccionados con trombosis venosa y cerca de 1% de controles normales tenian un cambio de nucleótidos en la base 20210 del gen de la protrombina (Franchini *et al* 2006 Poort *et al* 1996) Éste factor denominado Factor II de la coagulación es una proteina dependiente de vitamina K, que en el proceso de coagulación se trasforma en trombina (serina proteasa) y en el mismo proceso se encarga de producir fibrina La protrombina se encuentra codificada en el cromosoma 11 en posicion 11p11-q12 el gen de la protrombina posee 14 exones separados por 13 intrones en la región 5 y una región no traducida en la región 3 (McGlennen *et al* 2002)

La mutación 20210 fue descubierta por (Poort *et al* 1996) y en esta ocurre un cambio de G por A en la base 20210 en la región no traducida 3 del gen (ver figura 7) Los análisis de haplotipos sugieren que la mutación apareció de un unico fundador hace 20000 o 30000 anos En Europa, la prevalencia es del 2% con un rango de 0 7-4% La prevalencia mas alta parece encontrarse en las regiones del sur (aproximadamente 1 7%)

En los Estados Unidos se estima entre 1 y 2%. La mutación no es común en afroamericanos, asiáticos y nativos americanos (McGlennen *et al.*, 2002).

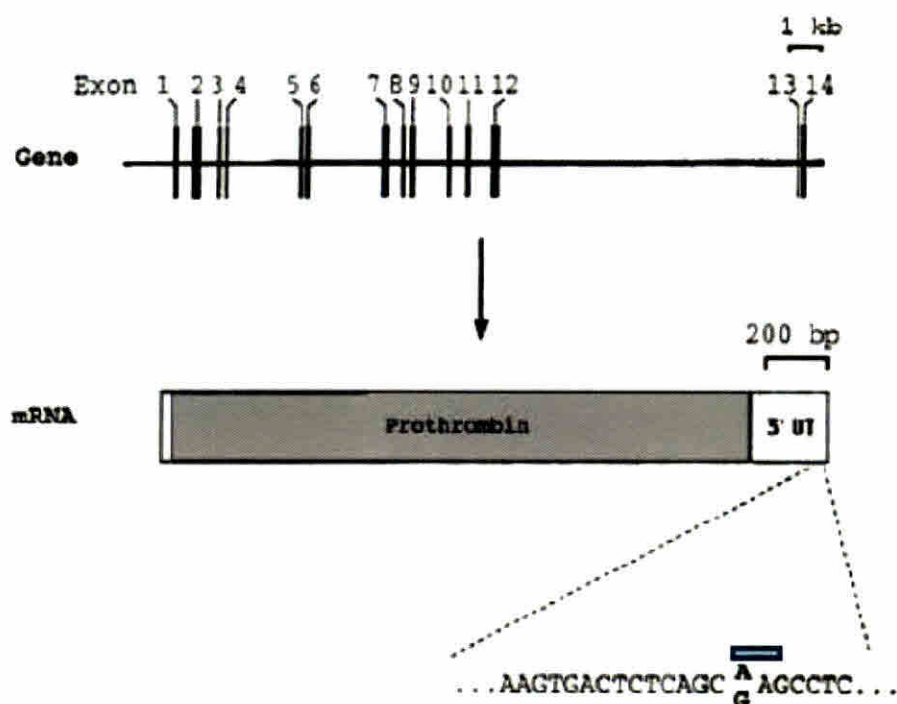


Figura 7. Estructura del gen de la protrombina humana y localización de la mutación 20210 G por A. El gen de la protrombina comprende 14 exones y se extiende aproximadamente 20Kb de ADN en el cromosoma 11. Los exones son representados por barras negras y los intrones por líneas. El RNAm tiene un tamaño aprximado de 2.1 Kb y se compone de una región traducible (caja gris) y regiones 5' y 3' no traducibles (cajas claras). La secuencia nucleotídica que flaque la transición G por A en el nucleótido 20210 en la región 3'UTR se indica en negritas. Tomado de (Zoller, *et al.*, 1999).

La primera descripción de la mutación, los heterocigotos presentaban una media plasmática de niveles de protrombina significativamente mayor (1.32 U/mL) comparados con individuos con genotipo silvestre (1.05 u/mL). Por su parte, los homocigotos mutados presentaban niveles de 1.70 u/mL. Un reporte reciente demuestra que la

mutación G por A genera una ganancia de función debido a un incremento en el reconocimiento de la señal de clivaje en la región 3. El resultado final es la acumulación de mRNA y por tanto un aumento en la síntesis de protrombina. Otros han mostrado que los niveles elevados pueden inhibir la proteína C activada mediada por una inactivación del Factor Va, lo cual llevaría a una intensificación en la generación de trombina después de iniciada la coagulación (McGlennen *et al* 2002).

Numerosos estudios de casos y controles han demostrado de manera más o menos consistente la asociación entre la mutación y la enfermedad tromboembólica. Se reportó un aumento en el riesgo de casi 3 veces (OR 2.8, 95% IC 1.4-5.6) (Poort *et al* 1996). Desde entonces otros estudios han estimado un riesgo relativo para trombosis venosa entre 2 y 12, estando la mayoría de los estudios en un rango de 2 a 3 (Segal *et al* 2002).

1.4.3 Polimorfismos en la enzima Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)

La homocisteína es un aminoácido trombogénico sulfurado que se forma en el metabolismo de la metionina. Se cataboliza a cisteína por la vía de la transulfuración con la intervención de dos enzimas dependientes de la vitamina B6 (cistationina B sintasa y cistationasa) o puede ser remetilada a metionina, proceso en el que interviene la enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR). Esta enzima cataliza la conversión de 5,10 metilentetrahidrofolato en una reacción dependiente de NADPH a 5

metilentetrahidrofolato; este metabolito que se produce en una reacción fisiológica irreversible, es uno de los tres dadores del grupo metilo en la conversión de homocisteína a metionina por la enzima metionina sintasa (Figura 8) (Bermúdez *et. al.* 2006; Ayala *et al.*, 2010; Key *et al.*, 2002).

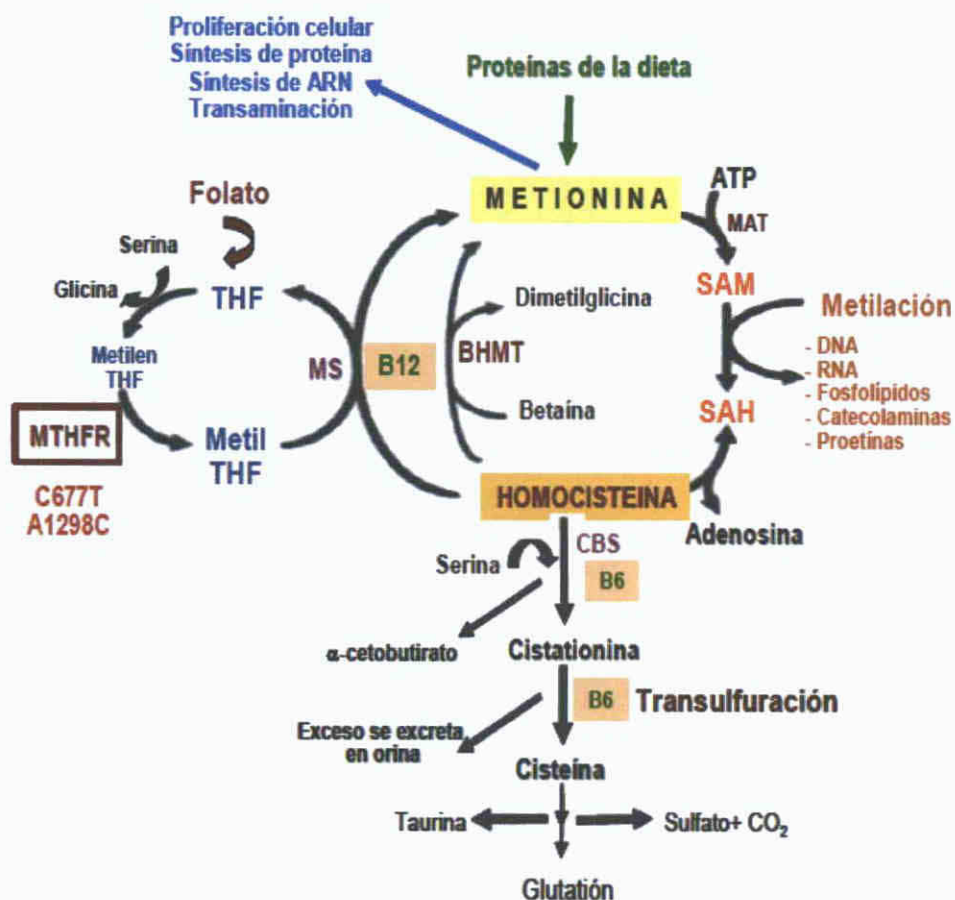


Figura 8. Metabolismo de la homocisteína. La Homocisteína se metaboliza por transulfuración a Cisteína, dependiente de B6 o por remetilación a Metionina. La remetilización esta catalizada por la Metionin Sintetasa (MS). SAM = S-adenosilmetionina. SAH = S-adenosilhomocisteína. THF = Tetrahidrofolato. BHMT = betahomocisteína metiltransferasa. CBS = Cistatoin-B-Sintetasa. MAT = Metionin adenosin transferasa. MTHFR = Metilentetrahidrofolato reductasa. Tomado de (Acuña, M. 2009).

Se han propuesto varias hipótesis acerca de los posibles roles de la homocisteinemia en la enfermedad vascular. Se estudia el efecto en el endotelio secundario al daño por auto oxidación de la homocisteína, alteraciones en las células musculares lisas (respuesta proliferativa y aumento en la producción de colágeno) y otros efectos que se pueda tener en las vías de coagulación como la inducción de la síntesis del factor tisular por parte de los monocitos, activación plaquetaria y biosíntesis de tromboxano. Recientemente se ha reportado que la homocisteína de una manera dosis dependiente puede llevar a alteraciones del factor Va lo cual resulta en una reducción en su tasa de clivaje por la proteína C activada (Key *et al* 2002).

El gen de la MTHFR se encuentra localizado en el cromosoma 1p36. Se publicó un polimorfismo en el gen que codifica el dominio catalítico de la MTHFR (Frosst *et al* 1995) mientras que en otro estudio reportaron un alza de 20% en los niveles de homocisteína plasmática en los portadores homocigóticos de este polimorfismo (Brattström *et al* 1994).

Esta variante muestra una actividad reducida de la enzima a 37 °C y aumenta su termolabilidad a 46 °C de aquí que se refieran a ella como la variante termolábil. Este polimorfismo se debe a una sustitución de C por T en la base 677 el cual codifica un cambio de aminoácido de alanina por valina. Aproximadamente el 12% de la población en los Estados Unidos es homocigota para esta mutación y la hiperhomocisteinemia típicamente se manifiesta cuando los niveles de folato se encuentran en el extremo inferior de los rangos normales (Bermúdez *et al* 2006, Ayala *et al* 2010, Key *et al* 2002).

El riesgo que conlleva la presencia de este polimorfismo es de aproximadamente 2.5 veces para presentar un evento de trombosis venosa sin embargo su asociación al factor V de Leiden se acompaña de un aumento del riesgo y sirve como un ejemplo de la interacción gen-gen en las trombofilias (Key *et al* 2002 Den Heijer *et al* 2005)

Otras variantes que han sido detectadas incluyen la A1298C que genera un cambio de glutamina por alanina y ha sido implicada en la patogenia de los defectos del tubo neural (Weisberg *et al* 1998 Van der Put *et al* 1998) la T1068C y la T1317C no son clínicamente significativas (Key *et al* 2002)

1.5 TROMBOFILIA E IMPACTO EN EL EMBARAZO

El aborto es definido como la pérdida del embarazo antes de la semana 20 de gestación y se encuentra asociado a desordenes genéticos al azar que no recurren en un embarazo subsiguiente (Pabinger *et al* 2005)

Los abortos recurrentes se definen como la pérdida consecutiva de tres embarazos y la probabilidad clínica de que esto se presente es de aproximadamente 0.8%. En 1996 se hicieron los primeros reportes que establecían una asociación entre esta entidad y algunas trombofilias (Rey *et al* 2003). La mayoría de estos estudios incluyen el análisis del Factor V de Leiden, protrombina 20210 y MTHFR C677T. En el más grande de ellos se investigó la asociación entre el factor V de Leiden y abortos recurrentes en más de 1000 mujeres caucásicas y en este estudio no se demostró una asociación directa pero sí un aumento en el número de mujeres con resistencia a la proteína C activada en comparación con los controles (Rai *et al* 2006). Sin embargo en otro meta-análisis los datos muestran

un aumento en los Odds Ratio (OR) de aproximadamente 2 ó más para el Factor V de Leiden OR similares se han demostrado para portadores de la mutación de protrombina G20210A (Rey *et al* 2003) Por otra parte los hallazgos relacionados a MTHFR han sido contradictorios (Rai *et al* 2006) Es importante además tener en cuenta el genotipo paterno e incluso el fetal puesto que estudios prospectivos en parejas en donde cualquiera de los dos tiene la mutación han mostrado un riesgo significativamente alto de aborto comparado con parejas en las cuales ninguno tiene la mutación (Jivraj *et al* 2006)

Los reportes histomorfológicos han mostrado compromiso de los vasos sanguíneos con trombosis vascularización de las vellosidades infartos fibrosis y vasculopatía decidual Se ha reportado que estos infartos son más significativos cuando los fetos tenían el alelo del FV de Leiden en comparación a genotipos normales (Raspollini *et al* 2007)

A pesar de la falta de más estudios prospectivos randomizados en mujeres con abortos recurrentes que tienen un defecto trombofílico se han hecho tratamientos con anticoagulantes en otro tipo de estudios usualmente heparina y ocasionalmente aspirina Uno de estos estudios se realizó en mujeres embarazadas con pérdidas no explicables antes de la semana 10 y con Factor V de Leiden o mutación en la protrombina Ochenta de estas mujeres recibieron 40 mg de enoxaparina subcutáneamente y los controles tomaron 100 mg de aspirina al día Los resultados mostraron que 86% de las mujeres tratadas con heparina tuvieron un embarazo a término sin problemas en comparación con el grupo control con tan solo el 29% (Rai *et al* 2006)

Se requiere mas evidencia para decidir que tratamiento con heparina debena ser recomendado para mujeres embarazadas con trombofilia y perdidas recurrentes. Lo que si es claro es que su administración disminuye significativamente el riesgo de eventos tromboembólicos durante el embarazo lo cual es particularmente importante para mujeres trombofílicas que no tengan disponible otras alternativas de tratamiento de eficacia probada (Rai *et al* 2006)

Existen diferentes publicaciones que reportan la prevalencia y asociación de la mutación en el Factor V (G1691A) Factor II (G20210A) y la MTHFR C677T como causas de perdida gestacional recurrente (Ver tabla 1 y 2)

Publicación	Población de estudio	Trombofilias	Casos (n)	Controles (n)	Prevalencias Casos %	Prevalencias Controles%	OR (IC)
Kutteh <i>et al</i> , 1999 (USA)	Caucásica	FVL PT MTHFR	1/50 1/50 4/50	2/50 1/50 2/50	2.1 2.1 8	4 2.1 4	0.5(0.04-5.5) 1 (0.14-7.3) 2.1(0.64-6.6)
Martinelli <i>et al</i> , 2000 (Italia)	Caucásica	FVL PT MTHFR	5/67 6/67 9/67	6/232 7/232 46/232	7 9 13	3 3 20	3.2 (1.0-10.9) 3.3 (1.1-10.3) 0.8(0.5-1.2)
Foka <i>et al</i> , 2000 (Grecia)	Caucásica	FVL PT MTHFR	15/80 7/80 6/80	4/100 2/100 15/100	18.7 9 8	4 2 15	5.5 (1.7-17) 4.6(0.9-23.2) 0.4 (0.1-1.2)
Carp <i>et al</i> , 2002 (Israel)	Caucásica	FVL PT MTHFR	4/108 5/108 14/108	5/82 5/82 7/82	3.7 4.6 12.9	6.1 6.1 8.5	0.6 (0.12-2.6) 0.7(0.17-3.1) 1.6 (1.6-4.6)
Alonso <i>et al</i> , 2002 (España)	Caucásica	FVL PT MTHFR	2/75 4/75 9/75	1/75 2/75 7/75	3 5 12	1.3 3 9	NS NS NS
Quintero <i>et al</i> , 2006 (México)	Mestiza	FVL PT MTHFR	5/119 0/119 20/120	10/218 7/216 42/213	4 0 17	5 3 20	NS NS NS
TESIS	Mestiza	FVL PT MTHFR	2/130 4/130 38/130	1/137 2/137 37/137	1.5 3.1 29.2	0.7 1.5 27	NS NS NS

Tabla 1. Prevalencia de trombofilia hereditaria como causa de PGR, en diversas publicaciones (Acuña, M. 2009).

Publicación	Diseño del estudio	Descripción de la población	Tipo (s) de pérdida	Trombofilia heredada	Estadística para asociación (p<0.05)	Trombofilia adquirida	P<0.05	Calidad del estudio
Rai <i>et al</i> , 2001 (Inglaterra)	Retrospectivo de casos y controles	Casos= 904 Mujeres con ART. Controles= 150 mujeres sin complicación del embarazo	ART= 3 pérdidas fetales < 12 sdg	FLV	p=NS	RPCA ACA. AL	p=S p= NS	1,si; 2, si; 3, NE; 4. Si; 5, si
Alfirevic <i>et al</i> , 2001 (Inglaterra)	Retrospectivo de casos y controles	Casos=18 mujeres con muerte fetal. Controles=44 mujeres sin pérdida	Muerte fetal > 23 sdg	FLV PT MTHFR (C677T) PC, PS, AT	OR= 1.2 (p=NS) OR= 1.2 (p=NS) OR= 0.7 (p=NS)	RPCA	p=S	1,si;2,si; 3, NE,4, no 5, si
Carp <i>et al</i> , 2002 (Israel)	Retrospectivo de casos y controles	Casos=108 mujeres con AER, Controles=82 mujeres sin pérdida	AER ≥3 pérdidas ≤ 26 sdg	FLV PT MTHFR (C677T)	OR= 0.6 (p=NS) OR= 0.7 (p=NS) OR= 1.6 (p=NS)	ACA, AL + resto de trombofilias	p=NS	1,si;2,si; 3, NE,4, no 5, si
Alonso <i>et al</i> , 2002 (España)	Prospectivo de casos y controles	Casos=75 mujeres con ≥1 pérdida fetal inexplicada. Controles=75 mujeres con ≥ 1 embarazo exitoso y sin complicaciones	Pérdida fetal muerte fetal ≥ 23 sdg	FLV PT MTHFR (C677T) AT,PC,PS	p=NS OR= 0.6 (p=NS) OR= 0.7 (p=NS) p=NS	ACA,AL, hiperhomocitemia	p=S	1,si;2,si; 3, NE,4, si; 5, si
Balasch <i>et al</i> , 1997 (España)	Retrospectivo de casos y controles	Casos= 55 Mujeres con ARE inexplicado. Controles= 50 mujeres con > 1 nacido vivo y sin abortos	ARE ≥ 2 abortos espontáneos del 1er trimestre	FVL-RPCA PC,PS	p=NS p=NS	ACA. AL	p= NS	1,si; 2, si; 3, NE; 4. NE; 5, si
Nelen <i>et al</i> , 1997 (España)	Retrospectivo de casos y controles	Casos=185 mujeres con PGR temprana. Controles=113 mujeres sin pérdida	PGR temprana ≥ 2 pérdidas fetales < 17 sdg	MTHFR (C677T)	OR= 3.3 (p=S)	-----	-----	1,si;2,si; 3, NE,4, NE 5, si
Grandone <i>et al</i> , 1997 a 1997b (Italia)	Retrospectivo de casos y controles	Casos=43 mujeres con AER, Controles=118 mujeres sin pérdida	AER ≥2 pérdidas inexplicables en el 1er trimestre	FVL MTHFR (C677T)	OR= 4.4 (p=S) p=NS	-----	-----	1,si;2,si; 3, NE,4, NE 5, si
Tal <i>et al</i> , 1999 (Israel)	Retrospectivo de casos y controles	Casos=125 mujeres con pérdida del embarazo. Controles=125 mujeres con ≥ 1 embarazo exitoso y ninguna pérdida	Pérdida del embarazo del 1er ó 2do trimestre	FVL PC,PS y AT III	p=S p=NS	RPCA ACA AL	p=NS p=NS p=NS	1,si;2,si; 3, NE,4, no; 5, si

Tabla 2. Publicaciones que estudian la asociación de trombofilia y pérdida gestacional recurrente (Acuña, M. 2009).

Publicación	Diseño del estudio	Descripción de la población	Tipo (s) de pérdida	Trombofilia heredada	Estadística para asociación (p<0.05)	Trombofilia adquirida	P<0.05	Calidad del estudio
Souza <i>et al</i> , 1999 (Brasil)	Retrospectivo de casos y controles	Casos= 56 Mujeres con pérdida del embarazo. Controles= 384 mujeres sin pérdida	AR ≥ 3 pérdidas fetales	FVL PT	OR= 4. (p=NS) OR= 3.5 (p=S)	-----	-----	1, si; 2, si; 3, NE; 4, no; 5, si
Brenner <i>et al</i> , 1999 (Israel)	Retrospectivo de casos y controles	Casos=76 mujeres con pérdida fetal. Controles=106 mujeres sin pérdida	Pérdida fetal ≥ 3 pérdidas en 1er trimestre; ≥ 2 pérdidas en 2do trimestre, 1 en 3er trimestre	FVL PT MTHFR (C677T)	OR= 4.0 (p=S) OR= 2.2 (p=NS) OR= 1.9 (p=NS)	-----	-----	1, si; 2, si; 3, NE; 4, no; 5, si
Foka <i>et al</i> , 2000 (Grecia)	Retrospectivo de casos y controles	Casos=80 mujeres con AER. Control =100 mujeres con ≥ 1 embarazo y ninguna pérdida	AER ≥ pérdidas del 1er o 2do trimestre	FVL PT MTHFR (C677T)	OR= 5.5 (p=S) OR= 4.6 (p=S) OR= 0.4 (p=NS)	-----	-----	1, si; 2, si; 3, NE; 4, no; 5, si
Pickering <i>et al</i> , 2001 (Inglaterra)	Retrospectivo de casos y controles	Casos=122 mujeres con pérdida temprana y tardía del embarazo. Controles=66 mujeres sin pérdida o con trombosis	Pérdida temprana ≥ 3 pérdidas fetales < 12 sdg; tardía > 12 sdg	PT	OR= 0.71 p=NS	-----	-----	1, si; 2, si; 3, NE; 4, si; 5, si
Couto <i>et al</i> , 2005 (Brasil)	Retrospectivo de casos y controles	Casos= 88 Mujeres con AER. Controles= 82 mujeres con ≥ 1 embarazo exitoso	ARE ≥ 3 pérdidas	FVL PT MTHFR (C677T) PC, PS y AT III	OR= 7.2 (p=NS) OR= 1.0 (p=NS) OR= 3.1 (p=S) P= NS	ACA MTHFR+ACA AL+resto de trombofilia excepto ACA	p=S p=S p= NS	1, si; 2, si; 3, NE; 4, No; 5, si
Jivraj <i>et al</i> , 2006 (Londres)	Prospectivo de casos y controles	Casos=357 parejas con pérdida del embarazo. Controles=68 parejas sin PGR	PGR ≥ 3 del primer trimestre (< 12 sdg)	FVL PT MTHFR (C677T)	p=NS P=NS P=NS	-----	-----	1, no; 2, no; 3, no; 4, no; 5, no
Quintero <i>et al</i> , 2006 (México)	Prospectivo de casos y controles	Casos > 100 mujeres y sus parejas con ≥ 3 abortos. Controles >200 personas de ambos sexos.	Aborto habitual no especifica el periodo	FVL PT MTHFR ECA TNF	P=NS P=NS P=NS P=NS p=NS	-----	-----	1, no; 2, no; 3, no; 4, no; 5, no

Tabla 2. Publicaciones que estudian la asociación de trombofilia y pérdida gestacional recurrente. (Acuña, M. 2009).

Criterios de calidad: 1. cohorte representativa; 2. averiguación fidedigna de fuentes; 3. evaluación ciega de resultados; 4. Comparación de factores confusores; 5. seguimiento apropiado, FVL. factor V Leiden, MTHFR. metilentetrahidrofolato reductasa; PC proteína C ; PS proteína S, ACA anticuerpos.

1.6 PRUEBAS GENÉTICAS PARA DETECCIÓN DE ALTERACIONES EN FACTORES DE COAGULACIÓN

Hay varias razones para que los médicos en la práctica diaria soliciten una prueba de trombofilia genética para sus pacientes

1 Para proveer una explicación de la causa de Tromboembolismo venoso dado el carácter multifactorial de la entidad. Los estudios informan que la sola presencia de una o más factores heredados no es suficiente para explicar la causa de la entidad pero si influyen elevando el riesgo (Mazzolai *et al* 2007)

2 Para establecer el riesgo de recurrencia y determinar la duración de la anticoagulación (Mazzolai *et al* 2007)

3 Para predecir el riesgo en familiares asintomáticos (Mazzolai *et al* 2007)

Dado que durante los últimos 25 años se han venido estudiando las mutaciones en los genes del sistema coagulación/anticoagulación como factores de riesgo para el tromboembolismo venoso concomitantemente se han estado desarrollando métodos diagnósticos moleculares (Cooper *et al* 2007)

Los métodos basados en DNA para detectar este tipo de alteraciones se encuentran ampliamente disponibles en los laboratorios para probar definitivamente la presencia del polimorfismo o mutación cada uno con ventajas y desventajas a la hora de seleccionarlos y utilizarlos (tabla 3). Entre ellos están aquellos basados en la amplificación genómica por medio de la PCR y los que se basan en otros métodos.

Método	Prueba	Ventajas	Desventajas
Basados en PCR	RED-PCR múltiplex	Ampliamente disponible, precisa y efectiva	Multipasos; ensayo manual. Riesgo de mala interpretación con la presencia de múltiples bandas
	ARMS	No requiere enzimas de digestión para restricción	Riesgo de toxicidad con bromuro de etidio (si se usa)
	SSCP	Puede detectar mutaciones inusuales	Falta de especificidad. Discriminación pobre de otras mutaciones
	ELISA	Sencillo	Ensayo manual
	FRET	Resultados disponibles en menos de 2 horas. Muy sensible. Puede	Alto costo del equipo. Mayor riesgo de contaminación
		detectar mutaciones inusuales	
	Secuenciamiento	Sencillo y rápido	Alto costo
	Microarray	Completamente automatizado	Necesita DNA purificado
No basados en PCR	Invader	Sencillo, de fácil interpretación con su software	Requiere alta concentración de DNA purificado

Tabla 3. Métodos disponibles para la detección de factor V de Leiden y Factor II G20210A. PCR=reacción en cadena de la polimerasa; FRET= transferencia de energía por resonancia de fluorescencia; RED= digestión por enzimas de restricción; ARMS= sistema de amplificación refractaria mutacional; SSCP= polimorfismo conformacional de cadena única; ELISA= ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas. Tomado de Cooper P.C, Rezende S.M. An overview of methods for detection of factor V Leiden and the prothrombin G20210A mutation (Cooper et al., 2007).

Métodos basados en PCR:

Emplea primers específicos para amplificar la secuencia que contiene la mutación blanca, por ejemplo parte del exón 10 del FV y la parte 3' no traducida en protrombina. Posteriormente los productos de amplificación son corridos en un gel de electroforesis. Una variedad de métodos basados en PCR se han usado para la detección de estas mutaciones. Entre ellos están:

- Restricción por enzimas de digestión: Este método se basa en que las mutaciones o los SNPs pueden abolir o crear sitios de restricción para una enzima determinada, permitiendo discriminar el genotipo por visualización de los fragmentos de diferentes

tamano al separarlos por electroforesis en agarosa o acrilamida Si más de una mutación va a ser detectada en una multiplex los fragmentos digeridos deben ser de un tamaño suficiente para permitir una interpretación clara y simple del gel (Cooper *et al* 2007)

Amplification refractory mutation system (ARMS) es una técnica multiplex en donde los alelos silvestres y mutados son amplificados concomitantemente con primers específicos para cada genotipo con producción de amplicones específicos de diferente tamaño molecular Los productos son detectados por electroforesis en agarosa o acrilamida (Cooper *et al* 2007)

Polimorfismo conformacional de cadena única (SSCP) El DNA amplificado es denaturado a cadenas únicas y luego analizado por electroforesis La movilidad de la molécula depende de la longitud del amplicon del peso molecular y en general por su conformación la cual está determinada por la secuencia de nucleótidos (Koksal *et al* 2007)

Ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas se hibrida un producto biotinilado de PCR con un oligonucleótido en una placa con pozos El conjugado de estreptavidina peroxidasa es añadido y finalmente un buffer de peróxido de hidrógeno con cromóforos detectan el amplicón unido Al comparar la densidad del color generada entre las reacciones de los alelos silvestres y mutados con las sondas de oligonucleótidos se determina el genotipo (Cooper *et al* 2007)

Identificación por Fluorescencia de fragmentos de PCR en Tiempo Real los genotipos son detectados al comparar las temperaturas melting puesto que la del alelo mutado ocurre a una temperatura inferior que la del alelo silvestre (Cooper *et al* 2007)

Secuenciamiento directo de DNA específicamente la pirosecuenciación es la que se ha usado para detectar estas mutaciones. La reacción es monitoreada con la liberación de pirofosfato con conversión a ATP y detección por la reacción de luciferina/luciferasa (Cooper *et al* 2007)

Métodos no basados en PCR

Invader Assay Este método utiliza la enzima clivadora, un tipo de nucleasa que cliva las regiones no apareadas del DNA de al menos 1 pb. Independientemente del genotipo, dos sondas de oligonucleótidos llamadas Invasora y Primaria se unen y se disocian continuamente de una hebra blanco de DNA a 63 °C (Cooper *et al* 2007)

CAPITULO II

DISEÑO METODOLÓGICO

2 DISEÑO EXPERIMENTAL

2.1 TIPO DE ESTUDIO

Casos y controles prospectivos

2.2 POBLACIÓN A ESTUDIO

Definición de casos y controles

Grupo A 55 mujeres panamenas con historia de 2 o más pérdidas gestacionales (PGR) referidas al Laboratorio de Genética del Complejo Hospitalario Dr Arnulfo Arias Madrid para estudio de trombofilia genética a partir de enero del año 2013

Controles del grupo A 55 mujeres panameñas que tuvieron hijos sin antecedentes de PGR o Trombosis

Ambos grupos comprendían edades reproductivas entre 17 y 44 años

Grupo B 105 pacientes referidos al Laboratorio de Genética, por los servicios de Diagnóstico Prenatal Hematología, Gineco Obstetricia y Neurología del Complejo Hospitalario Dr Arnulfo Arias Madrid, que hubiesen presentado por lo menos un evento tromboembólico (ETE) ya sea accidente cerebro vascular (ACV) Trombosis venosa profunda (TVP) o tromboembolismo pulmonar (TEP) sin otros factores de riesgo a partir de enero del 2013

Controles del grupo B: 105 individuos panameños sin historia de Trombosis.

Ambos grupos presentaron edades entre 20 y 70 años.

2.3 METODOS

Recolección de las Muestras: Se tomó 3-5 ml de muestra de sangre periférica con anticoagulante EDTA (ácido etilendiaminotetraacético).

Extracción de ADN: se realizó extracción de ADN a partir de 200 ul de sangre periférica, con metodología de columnas, utilizando el KIT DNA Mini blood y el equipo automatizado QIAcube, siguiendo las indicaciones de la casa comercial (QIAGEN, <http://www.qiagen.com/>).

PCR Múltiple en tiempo Final: Se utilizó el Kit de Trombofilia de Elucigene TRP (Prueba de riesgo de trombosis) Catálogo: TH003B2, siguiendo el protocolo de la casa comercial . (GENPROBE, <http://www.genprobe.com/>).

El método empleado por la prueba Elucigene TRP se basa en el sistema de mutaciones refractarias a la amplificación (ARMS), una tecnología de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual nos permite detectar mutaciones puntuales sin necesidad de utilizar enzimas de restricción (Newton *et al.*, 1989).

La prueba se compone de dos mezclas de reacción complementarias. La primera mezcla de reacción (Mix A), amplifica específicamente todos los alelos que no se ven afectados por las mutaciones del factor V Leiden (R506Q), el factor II (protrombina

20210A) y la MTHFR (677C>T). La segunda mezcla de reacción (Mix B), contiene cebadores que amplifican específicamente sólo los alelos mutantes de R506Q, 20210A y 677C>T (MIX B). Cada mezcla de reacción incluye cebadores que amplifican secuencias de DNA que no corresponden al factor V Leiden, protrombina, ni a la MTHFR, como control interno de amplificación. Los productos amplificados (amplicones) de las dos reacciones se separan mediante electroforesis sobre un gel de agarosa; la presencia o ausencia de bandas en el gel indica el estado de los alelos del factor V Leiden (R506Q), el factor II (protrombina 20210A) y la MTHFR (677C>T).

Materiales utilizados para la PCR

Se utilizaron los materiales y equipos descritos en el Kit de Trombofilia de Elucigene TRP Catálogo: TH003B2, (GENPROBE, <http://www.genprobe.com/>).

Mezcla de reacción de PCR

Inicialmente realizamos la preparación de la enzima Taq Polimerasa, según el fabricante, con algunas modificaciones (ver tabla 4).

	Número de pruebas			
	5	10	20	50
Volumen de agua destilada estéril (uL)	21	42	84	210
Volumen de buffer de carga (uL)	30	60	120	300
Volumen de buffer de dilución (uL)	6	12	24	60
Volumen de Taq Polimerasa (uL) **	3	6	12	30
Volumen total (uL)	60	120	240	600

Tabla 4. Preparación de la Enzima Taq Polimerasa.

****Modificado, utilizamos la Taq Polimeraza de QiaGene en lugar de la AmpliTaq Gold (Rodríguez, K., Samaniego, N., Cedeño, J y Sotillo, L. 2010).**

Luego que preparamos la Ezima, procedemos a preparar las mezclas de reacción A y B en tubos de 1.5 ml por separado (ver Tabla 5).

	Número de pruebas							
	5		10		20		50	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Volumen de primer mix A (uL)	82.5		165		330		825	
Volumen de primer mix B (uL)		82.5		165		330		825
Volumen de enzima preparada (uL)	27.5	27.5	55	55	110	110	275	275
Volumen de $MgCl_2$ (uL)**	5	5	10	10	20	20	50	50
Volumen total (uL)	115	115	240	240	480	480	1150	1150

Tabla 5. Preparación de las Mezclas de reacción A y B.

**Modificado, agregamos 1 ul de $MgCl_2$ por cada reacción (Rodriguez, K., Samaniego, N., Cedeño, J., y Sotillo, L. 2010).

A continuación, alicuotamos 20 ul de cada Mix A y B en tubos de 0.2 ml por separado y agregamos 5 ul del ADN de los pacientes, control y blanco de reacción.

Luego precedimos a amplificar los productos de PCR con los siguientes ciclos (figura 9):

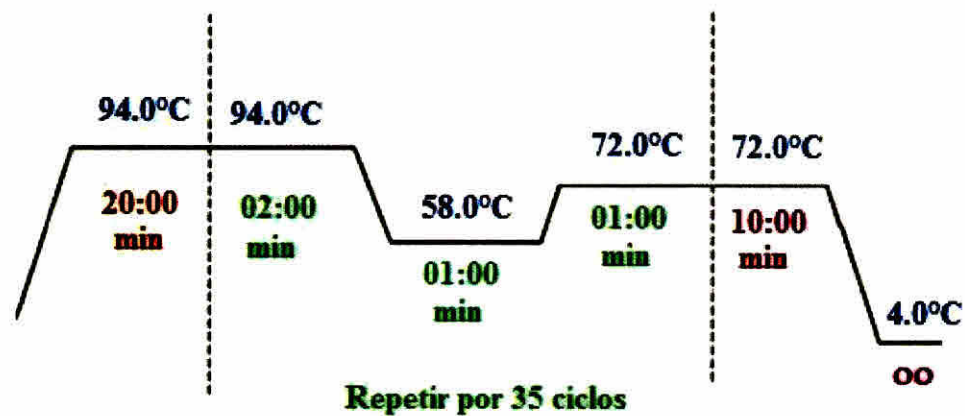


Figura 9. Ciclos de Amplificación utilizados en la PCR. (Samaniego, N., Rodriguez, K., Cedeño, J., y Sotillo, L. 2010).

Una vez terminado el programa de ciclos de amplificación, se pueden almacenar las muestras a temperatura ambiente de un día a otro o a 2-8 °C hasta 7 días antes de realizar el análisis mediante electroforesis en gel de agarosa.

Electroforesis en Gel

Los resultados del PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% mediante electroforesis.

Interpretación de las bandas de PCR

1 El control negativo no debe mostrar bandas dentro del área definida por las bandas de control superior e inferior

2 Las bandas de control superior e inferior deben estar claramente visibles en todas las muestras (ver Figura 10)

3 La posición de las bandas de control superior e inferior debe indicar el tamaño molecular correcto (ver Figura 10)

Si no se observa alguno de los puntos anteriores no deben interpretarse los resultados y debe llevarse a cabo una nueva prueba

La Figura 10 muestra un diagrama del tamaño en pares de bases y la ubicación relativa de los productos de la PCR en un gel que se espera para un genotipo de trombosis heterocigótico (con mutaciones del factor V el factor II o la MTHFR) utilizando el reactivo de la prueba de riesgo de trombosis

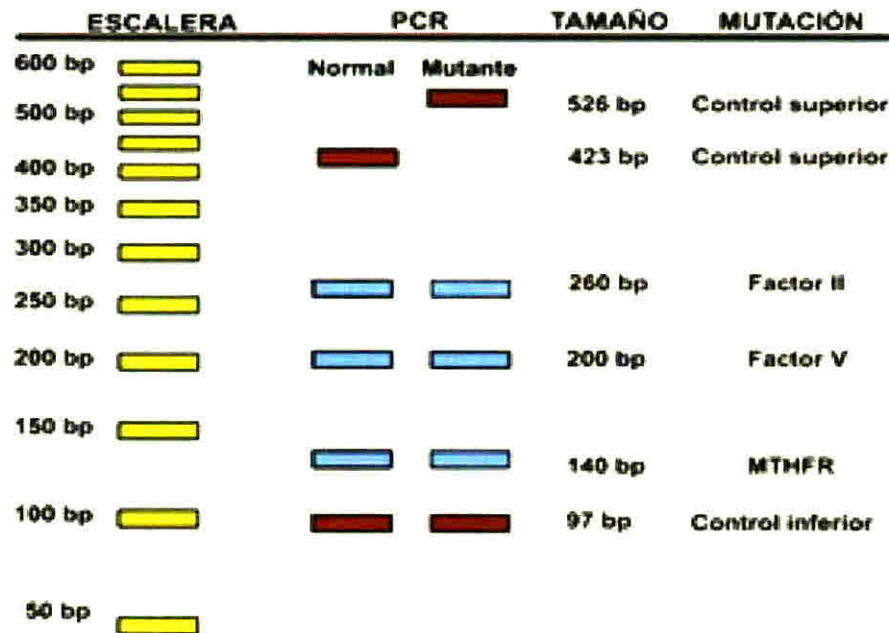


Figura 10. Diagrama del tamaño en pares de bases y la ubicación de los productos de PCR esperados utilizando el reactivo de la prueba de trombosis. Tomado de Elucigene TRP N° de cat. TH002B2.

Análisis de los Resultados: Se calculó las frecuencias alélicas (**Prevalencia**) y genotípicas de cada mutación.

Las **Frecuencias genotípicas** de una población son las proporciones o porcentajes de individuos de cada genotipo que están presentes en la población (Cabrero, J., y Camacho, J. 2002).

La frecuencia génica o **frecuencia alélica** consiste en la proporción de cada alelo en un locus dado en una población específica. La suma de las frecuencias alélicas en una población siempre es 1 (o 100%). Supongamos un gen con los alelos A y a, y sean n_{AA} , n_{Aa} y n_{aa} a los números de individuos con los genotipos AA, Aa y aa, respectivamente, de modo que $n_{AA} + n_{Aa} + n_{aa} = N$, siendo N el n° total de individuos de la población. Si representamos por X, Y y Z las proporciones de los genotipos AA, Aa y aa en la

población, las **frecuencias genotípicas** serán (Cabrero, J., y Camacho, J. 2002) ver figura 11:

$$X_{AA} = \frac{n_{AA}}{N}, \quad Y_{Aa} = \frac{n_{Aa}}{N} \quad \text{y} \quad Z_{aa} = \frac{n_{aa}}{N}, \quad \text{de forma que}$$

$$X_{AA} + Y_{Aa} + Z_{aa} = 1.$$

Figura 11. Fórmulas utilizadas para calcular la frecuencia genotípica. Toma de (Cabrero, J., y Camacho, J. 2002).

Las **frecuencias alélicas (prevalencia)** las calculamos a partir del número de individuos de cada genotipo, denominamos p a la frecuencia de A y q a la de a (Cabrero, J., y Camacho, J. 2002) ver figura 12:

$$p = \frac{2n_{AA} + n_{Aa}}{2N} = \frac{n_{AA} + \frac{1}{2}n_{Aa}}{N}, \quad \text{y} \quad q = \frac{2n_{aa} + n_{Aa}}{2N} = \frac{n_{aa} + \frac{1}{2}n_{Aa}}{N}$$

Figura 12. Fórmulas utilizadas para calcular la frecuencia alélica (prevalencia de la mutación). Tomado de (Cabrero, J., y Camacho, J. 2002).

Las variables continuas como la edad de los pacientes y controles se describieron en términos de media y rango.

Para comparar las prevalencias entre los pacientes y controles utilizamos una tabla tetracórica (2x2). En esta tabla se registra en las columnas el número de enfermos (pacientes) y no enfermos (controles) y en las filas el número de expuestos (con mutación) y no expuestos (sin mutación) ver tabla 6:

	Pacientes	Controles	Total
Con Mutación	a	b	a + b
Sin Mutación	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	a + b + c + d

Tabla 6. Tabla tetracórica (2x2) utilizada para comparar prevalencias y cálculos de Odds Ratio. Tomado de (Rothman, K., *et al.*, 1998).

La magnitud de la asociación entre mutación y caso se expresará como Odds Ratio (OR) con intervalos de confianza del 95%. Para calcular el Odds Ratio utilizamos la siguiente fórmula (<http://vassarstats.net/odds2x2.html>):

$$OR = (a*d) / (b*c)$$

La interpretación del Odds Ratio es similar a la razón de prevalencias; un valor de uno se interpreta como igual posibilidad de enfermar entre expuestos y no expuestos. Un valor mayor de uno significa que la posibilidad de enfermar es mayor en los expuestos que en los no expuestos. Un valor menor a uno significa que la posibilidad de enfermar es mayor en los no expuestos que en los expuestos (Rothman, K. *et al.*, 1998).

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3 1 RESULTADOS

En el presente estudio analizamos un total de 320 muestras las cuales las dividimos en dos grupos de pacientes y dos grupos controles

Grupo A (PGR) 55 mujeres con pérdida gestacional recurrente con edades entre 17 y 44 años con un promedio de 32 años (ver figura 13)

Controles Grupo A 55 mujeres con hijos sin historia de pérdida gestacional recurrente ni trombosis

Grupo B (Trombosis) 105 muestras de pacientes que sufrieron algún tipo de trombosis en edades comprendidas entre 20 y 67 años con un promedio de 37 años (Ver figura 14) De este grupo 10% fueron hombres y 90% mujeres (Ver figura 15)

Controles del Grupo B Se analizaron un total de 105 individuos sanos en edades comprendidas de 20 a 75 años con un promedio de 42 años (Ver figura 16) 16% hombres y 84% mujeres (Ver figura 17)

Mutación del Factor V Leyden esta mutación no fue detectada en las pacientes con pérdida gestacional recurrente (Grupo A) ni en los controles (ver tabla 7 y figura 21) En el grupo B detectamos siete (7) pacientes con esta mutación encontrando una prevalencia de 3 3% y en el grupo control se detectó un (1) individuo con esta mutación lo que nos da una prevalencia de 0 5% (Ver tabla 8 y figura 19)

Se encontró heterocigosidad para la mutación en el 6 7% de los pacientes del grupo B (Trombosis) y 1 0% en los controles No se registraron casos ni controles homocigotos para la alteración (ver tabla 10 y figura 20)

Se asoció fuertemente la mutación como causa de enfermedad en el grupo B de los pacientes con trombosis (OR 7.43, IC95% 0.89 a 61.48). No pudimos calcular Odds Ratio en el grupo de pacientes con PGR, debido a que no encontramos pacientes, ni controles con esta mutación (ver tabla 7).

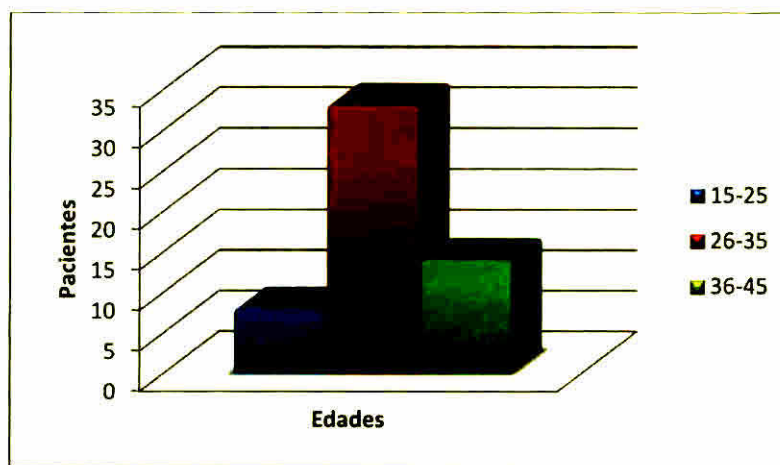


Figura N° 13. Número de pacientes en el grupo A (PGR) según la edad.

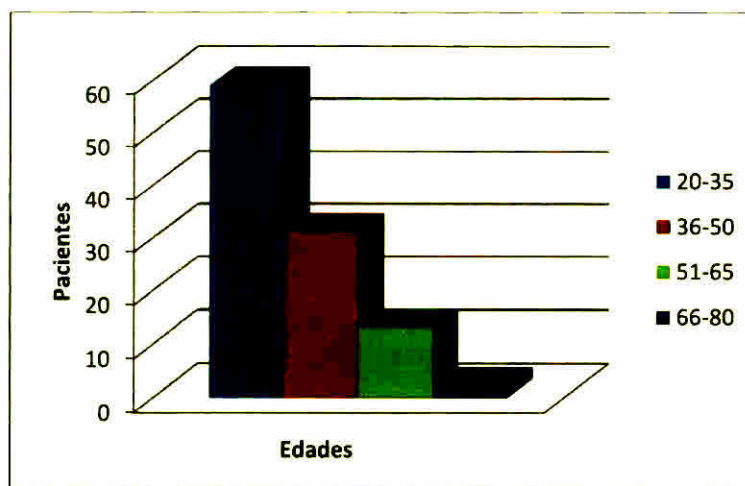


Figura N° 14. Número de pacientes en el grupo B (Trombosis) según la edad.

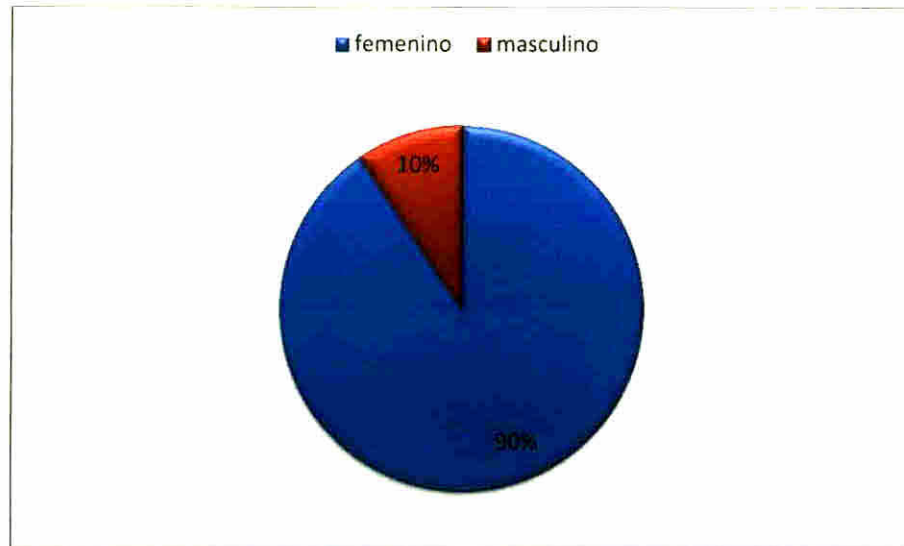


Figura 15. Porcentaje de pacientes en el grupo B (Trombosis) según Sexo.

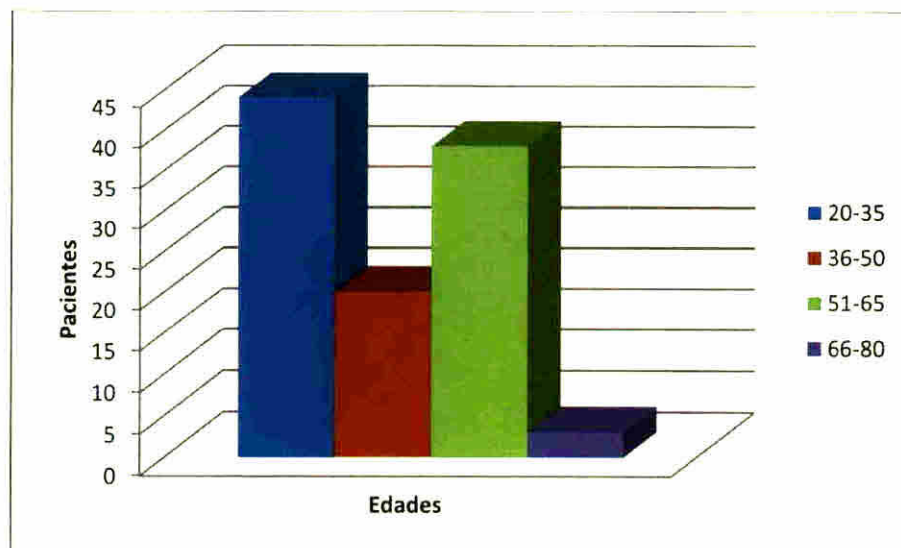


Figura N° 16. Número de pacientes en el grupo Control B según la edad.

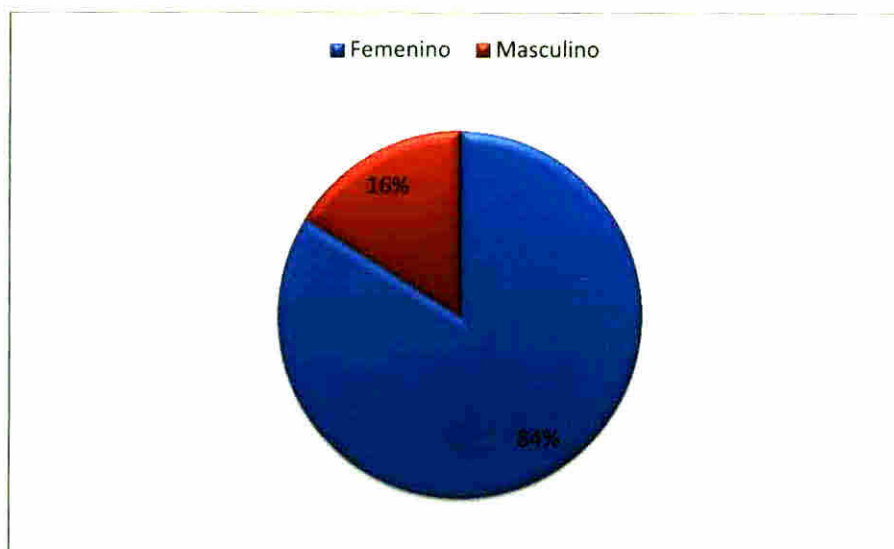


Figura 17. Porcentaje de individuos en el grupo Control B según Sexo.

POBLACIÓN	n	FACTOR V G1691A						FACTOR II G20210A						MTHFR C677T					
		GG	%	GA	%	AA	%	GG	%	GA	%	AA	%	CC	%	CT	%	TT	%
PGR	55	55	100	0	0.0	0	0.0	55	100	0	0.0	0	0	17	30.9	22	40.0	16	29.1
CONTROL	55	55	100	0	0.0	0	0.0	54	98.2	1	1.8	0	0	17	30.9	26	47.3	12	21.8

Tabla 7. Frecuencia genotípica del Factor V G1691A, Factor II G20210A y MTHFR C677T en el grupo de pacientes PGR y Control.

Factor V G1691A: GG = Homocigoto Normal, GA = Heterocigoto Mutado, AA = Homocigoto Mutado.

Factor II G20210A: GG = Homocigoto Normal, GA = Heterocigoto Mutado, AA = Homocigoto Mutado.

MTHFR C677T: CC= Homocigoto Normal, CT= Heterocigoto Mutado, TT= Homocigoto Mutado.

POBLACIÓN	n Individuos	n Alelos	FACTOR V G1691A				FACTOR II G20210A				MTHFR C677T			
			G	%	A	%	G	%	A	%	C	%	T	%
Grupo B (Trombosis)	105	210	203	96.7	7	3.3	205	97.6	5	2.4	131	62.4	79	37.6
Control B	105	210	209	99.5	1	0.5	208	99.0	2	1.0	126	60.0	84	40.0

Tabla 8. Prevalencia de la mutación en el Factor V G1691A, Factor II G20210A y MTHFR C677T en el grupo B (Trombosis) y grupo control B.

Factor V G1691A: G= Alelo Normal, A = Alelo Mutado.

Factor II G20210A: G = Alelo Normal, A = Alelo Mutado.

MTHFR C677T: C= Alelo Normal, T= Alelo Mutado.

POBLACIÓN	n	FACTOR V G1691A						FACTOR II G20210A						MTHFR C677T					
		GG	%	GA	%	AA	%	GG	%	GA	%	AA	%	CC	%	CT	%	TT	%
TROMBOSIS	105	98	93.3	7	6.7	0	0.0	100	95.2	5	4.8	0	0	45	42.9	41	39.0	19	18.1
CONTROL	105	104	99.0	1	1.0	0	0.0	103	98.1	2	1.9	0	0	41	39.0	44	41.9	20	19.0

Tabla 9. Frecuencia genotípica del Factor V G1691A, Factor II G20210A y MTHFR C677T en el grupo de pacientes con Trombosis y Control.

Factor V G1691A: GG = Homocigoto Normal, GA = Heterocigoto Mutado, AA = Homocigoto Mutado.

Factor II G20210A: GG = Homocigoto Normal, GA = Heterocigoto Mutado, AA = Homocigoto Mutado.

MTHFR C677T: CC= Homocigoto Normal, CT= Heterocigoto Mutado, TT= Homocigoto Mutado.

POBLACIÓN	n Individuos	n Alelos	FACTOR V G1691A				FACTOR II G20210A				MTHFR C677T			
			G	%	A	%	G	%	A	%	C	%	T	%
Grupo A (PGR)	55	110	110	100.0	0	0.0	110	100.0	0	0.0	56	50.9	54	49.1
Control A	55	110	110	100.0	0	0.0	109	99.1	1	0.9	60	54.5	50	45.5

Tabla Nº 10. Prevalencia de la mutación en el Factor V G1691A, Factor II G20210A y MTHFR C677T en el grupo A (PGR) y grupo control A.

Factor V G1691A: G= Alelo Normal, A = Alelo Mutado.

Factor II G20210A: G = Alelo Normal, A = Alelo Mutado.

MTHFR C677T: C= Alelo Normal, T= Alelo Mutado.

Mutación en Factor II: esta mutación no fue detectada en los pacientes con pérdida gestacional recurrente (Grupo A) y detectamos un (1) individuo alterado en el grupo control A (prevalencia de 0.9 %) (Ver figura 8). En el grupo B, detectamos cinco (5) pacientes con esta mutación, encontrando una prevalencia de 2.4%; y en el grupo control se detectó dos (2) individuos con esta mutación lo que nos da una prevalencia de 1.0% (Ver fig. 19).

Se encontró heterocigosidad para la mutación en el 4.8% de los pacientes del grupo B y 1.9% en los controles. No se registraron casos ni controles homocigotos para la alteración (ver tabla 9 y figura 20).

Se asocio la mutación como causa de enfermedad en el grupo B de los pacientes con trombosis (OR 2.58, IC95% 0.48 a 13.58), y no encontramos esta mutación en las pacientes que presentaban pérdida gestacional recurrente.

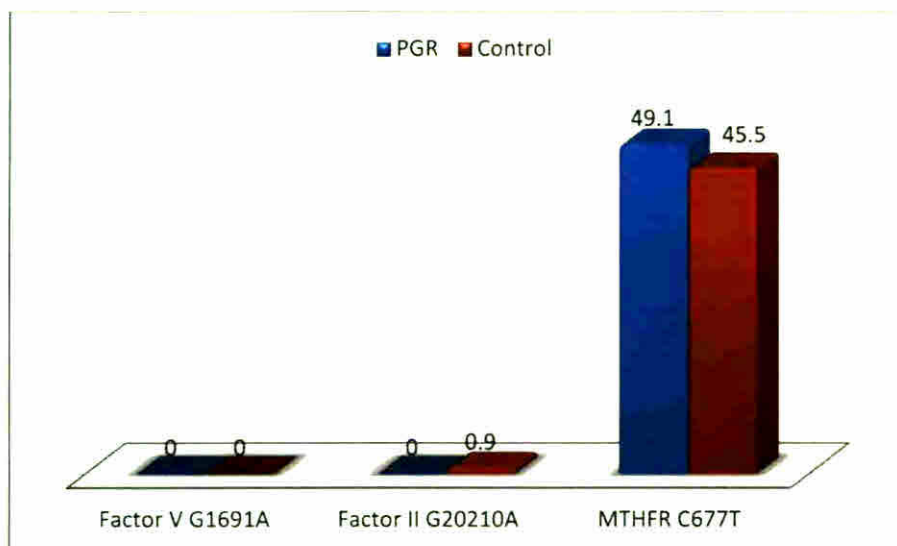


Figura 18. Prevalencia de la mutación en el Factor V G1691A, Factor II G20210A y MTHFR C677T en el grupo de pacientes con PGR y Control.

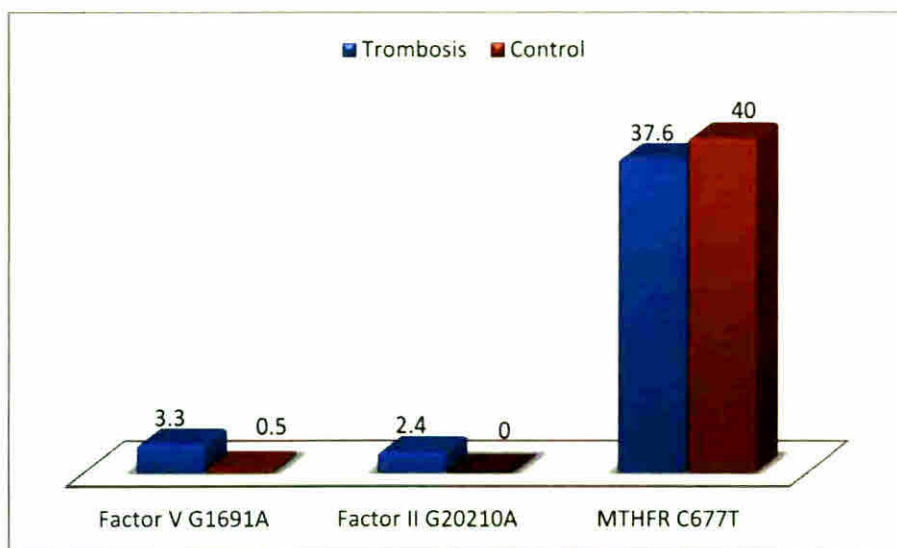


Figura 19. Prevalencia de la mutación en el Factor V G1691A, Factor II G20210A y MTHFR C677T en el grupo B (Trombosis) y grupo control B.

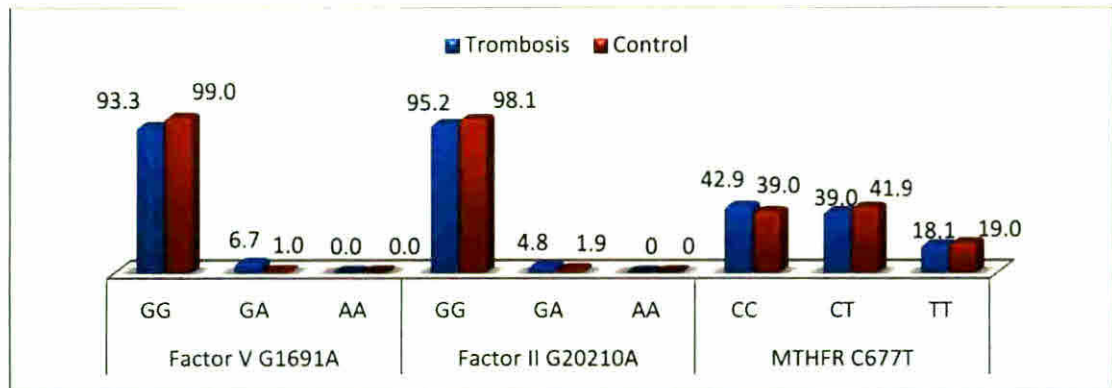


Figura 20. Frecuencia genotípica del Factor V G1691A, Factor II G20210A y MTHFR C677T en el grupo de pacientes con Trombosis y Control.

Mutación MTHFR (C677T): en el grupo de pacientes con PGR, detectamos 40% pacientes heterocigotos y 16 (29.1%) pacientes homocigotos para esta mutación (ver tabla 7), con una prevalencia 49.1%; en los controles del grupo A (ver tabla 10 y figura 18); en los controles encontramos 26 (47.3%) individuos heterocigotos y 12 (21.8%) homocigotos para la mutación, con una prevalencia de 45.5% (ver figura 18). En el grupo B, detectamos 41 (39.0%) pacientes heterocigotos y 19 (18.1%) pacientes homocigotos para la mutación, encontrando una prevalencia de 37.6%; y en el grupo control detectamos 44 (41.9%) individuos heterocigotos y 20 (19.0%) individuos homocigotos para la mutación lo que nos da una prevalencia de 40.0% (ver figura 19 y 20). No hubo asociación con la presencia de enfermedad en los grupos de pacientes con trombosis (OR 0.85, IC95% 0.49 a 1.48) ni con el grupo A (PGR) (OR = 1.0, IC95% 0.44 a 2.24).

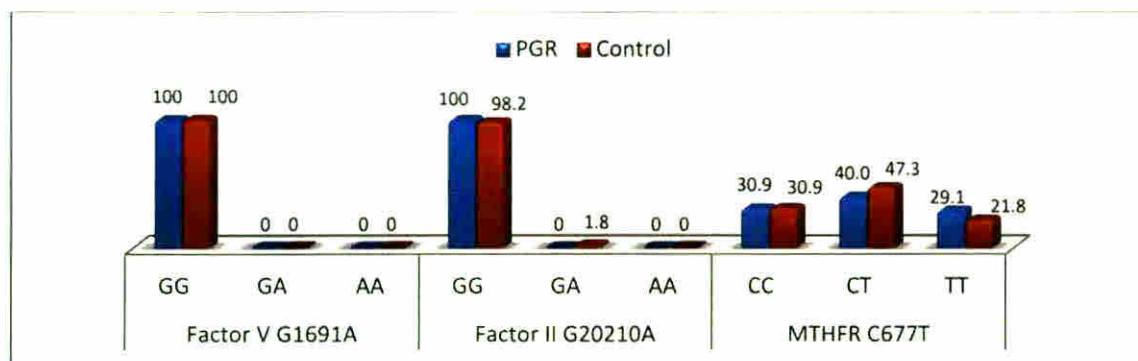


Figura 21. Frecuencia genotípica del Factor V G1691A, Factor II G20210A y MTHFR C677T en el grupo de pacientes PGR y Control.

3 2 DISCUSION

Al analizar los resultados de prevalencia en la mutacion del FV Leyden en el grupo B de pacientes que sufrieron algun tipo de trombosis identificamos un aumento del riesgo de enfermedad trombotica de 7 veces cuando se tiene esta mutación. Similar a lo encontrado en un estudio realizado en USA en donde la asociación del factor V Leyden como causa de trombosis venosa profunda, fue de 7 veces en los heterocigotos (Rossendorf *et al* 2007). En un estudio realizado en Colombia, reportaron un aumento del riesgo de trombofilia de 14 veces cuando se presenta la mutación del factor V Leyden (Garcia *et al* 2011).

La prevalencia de la mutación del Factor V Leyden fue de 3.3% en los 105 pacientes con eventos trombóticos estudiados y de 0.5% en los individuos controles (OR 7.43 IC95% 0.89 a 61.48) similar a lo reportado en un estudio realizado en Chile en 149 pacientes con trombosis diagnosticada y 160 controles en el cual la prevalencia del FV G1691A fue de 2.7% en los pacientes y 0.6% en el grupo control (OR=4.2 1.0 29.3 p 0.04) (Palomo *et al* 2005).

La heterocigocidad del Factor V Leyden en nuestro estudio fue de 6.7% en los pacientes con trombosis diagnosticada y de 1.0% en los controles. Similar a lo reportado en Chile (5.4% pacientes vs 1.3% controles) (Palomo *et al* 2005). Menor a lo reportado en Venezuela (18.2% heterocigotos con TVP y 3.9% en los controles) (Lopez *et al* 2007). Menor tambien a lo reportado en USA en un estudio de trombofilia de Leyden

(18% pacientes con trombosis vs 3% controles) (Rossendorf et al 2007) pero al igual que en nuestro estudio detectaron aumento de riesgo de 7 veces cuando se tiene la mutación. Cabe destacar que la frecuencia del FVL varía según el grupo étnico siendo más frecuente en poblaciones generales de Estados Unidos y Europa, que presentan porcentajes entre el 3 y el 8% de heterocigosidad en el factor V Leiden (Zoller *et al* 1997)

Un heterocigótico mutado para la mutación el factor V Leiden tiene 7 veces más probabilidades de presentar tromboembolia venosa, un homocigótico mutado para el factor V Leiden tiene un riesgo 80 (ochenta) veces mayor (Makris *et al* 1997). En nuestro estudio no encontramos pacientes ni controles homocigos mutados para el Factor V Leiden ni para el Factor II G20210A.

Con respecto a la mutación del Factor II G20210A encontramos una prevalencia de 2.4% y de 1.0% en el grupo control. La heterocigosidad para la mutación en el grupo de pacientes con trombosis fue de 4.8% y de 1.9% en control. Se detectó asociación del Factor II como riesgo de trombosis en el grupo de pacientes que sufrieron algún evento tromboembólico (OR 2.58 IC95% 0.48 a 13.58) pero menor que el FVL (OR 7.43 IC95% 0.89 a 61.48). Estos resultados son muy similares a los reportados en un estudio realizado en Chile en pacientes con trombosis en donde la prevalencia de la mutación PT G20210A fue 2.7% pacientes y 1.25% en el grupo control (OR=2.0 0.6 8.9 p NS) (Palomo *et al* 2005). En Italia y España estimaron que la presencia de este alelo incrementaba alrededor de 3 veces el riesgo de TVP (OR=3.88 IC del 95% 2.23-6.74 y

OR=3.1 IC del 95% 1.4 a 6.6 respectivamente) Italia (Margaglione *et al* 1998) España (Sout *et al* 1998) No obstante otros estudios no logran evidenciar un claro aumento de riesgo asociado a este alelo España (Aznar J *et al* 2000) y en Italia (Tosetto *et al* 1999)

La mutación de la protrombina G20210A se describió originalmente en la población danesa (Dinamarca) donde la prevalencia encontrada fue del 2.3% en controles sanos 6.2% en pacientes seleccionados con trombosis venosa profunda y 18% en pacientes seleccionados con historia familiar. Se ha identificado una mayor prevalencia de la mutación en Europa del sur (2.6% a 6.5%) en comparación a lo reportado para Europa del Norte (McGlennen y Key 2002). Ya que los datos de prevalencia en las poblaciones Amerindia y africana son extremadamente bajas la prevalencia en la población panameña de la mutación en la protrombina G20210A podría explicarse por la mezcla de la población con los Españoles en donde la frecuencia ha llegado a reportarse de hasta 6.5% (Torres J D 2006). Respecto al riesgo de desarrollar TVP en pacientes con esta mutación estudios informan un aumento en el riesgo de hasta 2 y 3 veces (Poort *et al* 1996) similar a lo detectado en nuestro estudio con un aumento de riesgo de 2 veces (OR 2.58 IC95% 0.48 a 13.58)

No encontramos la mutación del factor V Leyden o el Factor II G20210A en las pacientes con pérdida gestacional recurrente por lo que no asociamos estas mutaciones como causa de la PGR. Esta baja asociación también es reportada por varios autores como (Kutteh *et al* 1999 Alonso *et al* 2002 Carp *et al* Bezemer *et al* 2007). Sin embargo es importante mencionar que existen varias publicaciones que sí encuentran tal

asociación y que no apoyarían nuestros hallazgos (Kupfermick *et al* 1999 Nelen *et al* 2000 Rey *et al* 2003 Jivraj *et al* 2006) Por lo anterior expuesto la asociación de pérdida gestacional recurrente con las mutaciones estudiadas es motivo de controversia En un estudio casos y controles realizado en Estados Unidos en 192 pacientes con pérdida gestacional reportaron que la presencia de al menos 1 copia de FVL (OR 1.76 IC 95% 0.85 - 3.65 $P = 0.13$) o 1 copia del PT G20210A (OR 0.74 IC 95% 0.30 - 1.84 $P = 0.52$) no se asoció significativamente con el aborto espontáneo (Kocher *et al* 2007)

En Panamá realizamos un primer estudio descriptivo en cual determinamos la prevalencia del Factor V Leyden (2.09%) Factor II G20210A (0.95%) y la MTHFR C677T (35.74%) en 651 mujeres con pérdida gestacional recurrente que ingresaron al Laboratorio de Genética del CHDRAAM entre el 2007 y 2010 (Samaniego *et al* 2010) Continuando las investigaciones de trombofilia genética en las pacientes con PGR realizamos este estudio de casos y controles para conocer la asociación de estas mutaciones como causa de pérdida gestacional recurrente

Los polimorfismos de MTHFR siempre han estado rodeados de controversias Múltiples estudios de casos y controles han mostrado asociaciones entre trombosis arterial y venosa y los niveles de homocisteína en sangre sin embargo los resultados son contradictorios cuando se comparan con la prevalencia homocigótica en especial de MTHFR C677T (Den Heijer *et al* 2005) Un reciente meta análisis concluyó que a pesar de que la mutación causa leve hiperhomocisteinemia, no hay un aumento del riesgo cardiovascular Actualmente es generalmente aceptado que éste polimorfismo por sí solo no es un factor de riesgo para desarrollar una trombosis pero sí podría tenerse en cuenta

como un factor de sinergismo con otras condiciones trombofílicas. La frecuencia en este estudio del genotipo homocigoto en el grupo de PGR fue de 29.1% y de 21.8% en los controles; en el grupo de trombosis fue de 18.1% y de 19.0% en los controles. Los heterocigotos por su parte presentaron frecuencias similares: 40.0% PGR y 47.3% en los controles, 39.0% trombosis y 41.9% en los controles. Estos datos coinciden relativamente con un estudio realizado en Colombia en el cual reportaron una homocigocidad de 24% en los pacientes y 19.3% en los controles; la heterocigocidad se detectó en un 52% en los pacientes y en un 50% en los controles (Torres *et al.* 2006, Den Heijer *et al.* 2005). Dado estos resultados, el riesgo de presentar un evento tromboembólico con la presencia de este polimorfismo no puede establecerse debido a la alta frecuencia de la alteración en la población sana.

Aproximadamente el 12% de la población en los Estados Unidos es homocigota para el polimorfismo C677T de la MTHFR y la hiperhomocisteinemia típicamente se manifiesta cuando los niveles de folato se encuentran en el extremo inferior de los rangos normales (Bermudez *et al.* 2006, Ayala *et al.* 2010, Key *et al.* 2002). El riesgo que conlleva la presencia de este polimorfismo es de aproximadamente 2.5 veces para presentar un evento de trombosis venosa, sin embargo su asociación al factor V de Leiden se acompaña de un aumento del riesgo y sirve como un ejemplo de la interacción gen-gen en las trombofilias (Key *et al.* 2002, Den Heijer *et al.* 2005).

En una revisión de 4 estudios, aproximadamente el 75% de los miembros de una familia con dos defectos presentaron el evento en comparación al 10% de aquellos que

solo presentaban una alteración de lo que se infiere que el aumento del riesgo fue de aproximadamente 3 veces (Press *et al* 2002)

Otras variantes que han sido detectadas incluyen la mutación A1298C que genera un cambio de glutamina por alanina y ha sido implicada en la patogenia de los defectos del tubo neural (Weisberg *et al* 1998 Van der Put *et al* 1998) la T1068C y la T1317C no son clinicamente significativas (Key *et al* 2002)

Como dato curioso mencionamos que una paciente de 4 años con historia de trombosis la excluimos en la comparación de casos y controles por su edad y resultó heterocigota mutada para el Factor II G20210A esto nos indica que el hecho de presentar esta mutación en diferentes edades de la vida, es un factor importante que puede desencadenar una trombofilia genética

Es importante destacar que la mutación es una condición que predispone al desarrollo de la trombosis y sabemos que esto va ligado a la eficiencia de los cofactores que utiliza la enzima MTHFR para realizar su función normal y mantener niveles adecuados de la homosisteina Se requiere estudios prospectivos en donde los pacientes que presentaron la mutación se les realicen la medición de la concentración de la homosisteina en sangre para correlacionar los resultados

CONCLUSIONES

- 1 Este estudio nos permitió determinar la prevalencia de las mutaciones en el Factor V leyden en el Factor II G20210A y el polimorfismo de MTHFR C677T en pacientes con eventos trombóticos mujeres con PGR y realizar comparaciones con el grupo control**
- 2 Se detectó una fuerte asociación (riesgo de 7 veces) del Factor V Leiden como casusa de la trombosis en los pacientes con eventos tromboembolicos y menor asociación con la mutación del Factor II G20210A (riesgo de 2 veces)**
- 3 No asociamos la mutación del FVL y del Factor II G20210A como causa de la PGR, debido a que no encontramos pacientes positivos en la muestra estudiada**
- 4 No encontramos asociación del polimorfismo C677T de la MTHFR en los pacientes estudiados debido a la alta frecuencia en nuestra población La mutación es una condición que predispone al desarrollo de la trombosis y sabemos que esto va ligado a la eficiencia de los cofactores que utiliza la enzima MTHFR para realizar su función normal y mantener niveles adecuados de la homosisteina**

- 5 La detección de factores hereditarios facilita a los clínicos decidir sobre la instauración de terapias de anti coagulación duración del tratamiento y estudios de extensión a otros miembros de la familia

RECOMENDACIONES

Realizar un estudio prospectivo en donde se determine la concentración de ácido fólico y vitamina B12 (cofactores de la enzima MTHFR) en los pacientes que presentaron genotipos homocigotos mutados y correlacionar con los niveles de homocisteína en sangre ya que el riesgo de trombosis también se ha visto incrementado 3 4 veces cuando los pacientes presentan concomitantemente hiperhomocisteinemia (Torres et al 2006)

Finalmente se hace necesario comentar la tendencia hacia una interacción entre la mutación del Factor V y los polimorfismos de MTHFR. La mutación ocurre comúnmente y puede ser coheredada con otras trombofilias como deficiencias de la proteína C, proteína S, antitrombina, protrombina G20210A y MTHFR C677T por lo que se recomienda realizar un estudio de sinergismo con otras causas de trombofilia y evaluar el riesgo para desarrollar un evento trombótico.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ACUNA M** 2009 Perfil Trombótico y su asociación con la perdida gestacional recurrente Tesis Mexico D F Instituto Politécnico Nacional Escuela Nacional de Ciencias Biologicas
- ALONSO A** 2002 Acquired and inherited thrombophilia in women with unexplained fetal losses *Am J Obstet Gynecol* 187(5) 1337-42 págs
- AYALA C GARCIA R y CRUZ E** 2010 Niveles de homocisteina y polimorfismos de los genes de la MTHFR y la CBS en pacientes colombianos con trombosis venosa superficial y profunda *Biomedica* 30 259 67 págs
- AZNAR, J VAYA A ESTELLES A MIRA Y SEGUI R VILLA P** 2000 Risk of venous thrombosis in carriers of the prothrombin G20210A variant and factor V Leiden and their interaction with oral contraceptives *Haematologica* 85 1271-6
- BAUER K A y GOODNIGHT S H** 1998 Hypercoagulable states Translation of risk factors to clinical practice *Amer Society Of Hematology Education program book Hematology* 255 73 págs
- BERMUDEZ M BRICEÑO I y GIL F** 2006 Homocisteina y polimorfismos de cistationina B sintasa y metilentetrahidrofolato reductasa en población sana de Colombia *Colomb Med* 2006 37 46 52 págs
- BERTINA R M** 1997 Introduction Hipercoagulable status *Semin hematol* 34 167 70 págs
- BERTINA R M y ROSENDAAL F R** 1998 Venous thrombosis – the interaction of genes and environment *N Engl J Med* 338 1840 1841 págs
- BEZEMER I** 2007 No association between the common MTHFR 677C>T polymorphism and venous thrombosis results from MEGA study *Arch Intern Med* 167(5) 497 501 págs
- BLANN A D y LIP G Y** 2006 Venous thromboembolism *BMJ* 332 215 9 págs
- BOKAREWA M I BREMME K y BLOMBACK M** 1996 Gln mutation in factor V and risk of thrombosis during pregnancy *Br J Haematol* 92 473-478 págs

- BRATTSTRÖM L LINDGREAN A ISRAELSSON B 1994 Homocysteine and cysteine determinants of plasma levels in middle aged and elderly subjects J Intern Med, 236 633-641**
- CABRERO J Y CAMACHO J 2002 Capítulo 6 Fundamentos de Genética de Poblaciones Dep de Genética Facultad de Ciencias Universidad de Granada.**
- CARMONA BERRIGUETE S ARROYO BIELSA A y BARRIO RODRÍGUEZ C A 2003 Características de la trombosis venosa profunda en pacientes con Factor V de Leiden y mutación G20210A del gen de la protrombina. Angiologia 55 (4) 322 330 págs**
- CARP H 2002 Prevalence of genetic markers for thrombophilia in recurrent pregnancy loss Hum Reprod 17(6) 1633 7 págs**
- COOPER, P C y REZENDE S M 2007 An overview of method for detection of factor V Leiden and the prothrombin G20210A mutations Int Jnl Lab Hem 29 153 162 págs**
- DAHLBACK B CARLSSON M SVENSSON PJ Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C prediction of a cofactor to activated protein C Proc Natl Acad Sci USA 1993 90 1004 8**
- DEN HEIJER M LEWINGTON S y CLARKE R 2005 Homocysteine MTHFR and risk of venous thrombosis a meta analysis of Publisher epidemiological studies J Thromb Haemost 3 292-9 págs**
- ENDLER G y MANNHALTER C 2003 Polymorphisms in coagulation factor genes and their impact on arterial and venous thrombosis Clin Chim Acta 330 31 55 págs**
- FRANCHINI M VENERI D y SALVAGNO G L 2006 Inherited thrombophilia Crit Rev Clin Lab Sci 43 249 290 págs**
- FROSST P BLOM J MILOS R GOYETTE P SHEPPARD C MATTHEWS R BOERS G HEIJER M KLUIJTMANS L VAN DEN HEUVEL L 1995 A candidate genetic risk factor for vascular disease a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase Nat Genet 10(1) 111 3**
- GARCIA S 2011 Analisis mutacional del Factor V de Leiden protrombina G20210A y metilentetrahidrofolato reductasa C677T y A1298C en una muestra de pacientes**

con susceptibilidad a trombofilia Tesis Dep Patología Clínica Bogotá Colombia

GEERTS W CODE K JAY R CHEN E SZLAI J 1994 Venous thromboembolism following major trauma a prospective epidemiologic study N Engl J Med 331 1601-6

GILABERT J ESTELLÉS A ESPAÑA F GRANCHÀ S y AZNAR J 1997 Modificaciones de la hemostasis en obstetricia Cuaderno de Trombosis

HEIT JA SILVERSTEIN MD MOHR DN PETTERSON TM LOHSE CM OFALLON WM y MELTON LJ 2001 3rd The epidemiology of venous thromboembolism in the community Thromb Haemost 86 452-463 pags

JIVRAJ S RAI R UNDERWOOD J REGAN L 2006 Genetic thrombophilic mutations among couples with recurrent miscarriage Hum Reprod, 21 (5) 1161-1165 págs

KEY NS y MCGLENNEN RC 2002 Hyperhomocysteinemia and Thrombophilia Arch Pathol Lab Med, 126 1367-1375 pags

KOCHER O CIROVICI C MALYNN E CHARLES M BARE L YOUNG B HENSLEE J LAFFLER T HUFF J KRUSKALL M WONG G BAUER K 2007 Obstetric Complications in Patients With Hereditary Thrombophilia Identified Using the LCx Microparticle Enzyme Immunoassay A Controlled Study of 5 000 Patients American Journal of Clinical Pathology 127(1) 68-75

KOKSAL V BARIS I y ETLIK O 2007 Primer engineered multiplex PCR-RFLP for detection of MTHFR C677T prothrombin G20210A and factor V Leiden mutations Exp Mol Pathol Aug 83 1-3 págs

KUMAR, V ABBAS A y FAUSTO N 2008 Trastornos hemodinámicas enfermedad tromboembólica y shock En Robbins y Cotran Patología Estructural y Funcional 7ª edición Barcelona, España, Elsevier 121-138 págs

KUPFERMINC M ELDOR A STEINMAN N MANY A BAR AM A JAFFA A FAIT G y LESSING J 1999 Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy January 7 NEJM 340 9 págs

KUTTEH E 1999 Hypercoagulable state mutation analysis in white patients with early first trimester recurrent pregnancy loss Fertil Steril 71(16) 1048-53 págs

- LEME D A MANNUCCI P M y BERTINA R M 1996 Inherited Trombophilia Part I Thromb Hemost 76 651 62 págs
- LENS D BRUGNINI A y TRIAS N 2003 Association between recurrent pregnancy loss and prothrombotic gene polymorphisms 19th Congress of the International Society of Thrombosis and Haemostasis Birmingham UK 15th July 2003 J Throm Haem 1(Suppl 1) 0951 págs
- LENS D OTERO A y BRUGNINI A 2001 Prevalence of factor V Leiden, prothrombin 20210A and the thermolabile MTHFR in the uruguayan population Poster presentado en el 18th Congress of the International Society of Thrombosis and Haemostasis Paris J Throm Haem July 668 págs
- LÓPEZ J A KEARON C y LEE A 2004 Deep venous thrombosis Hematology Am Soc Hematol Educ Program 439 56 págs
- LOPEZ T DELGADO V PUENTES D ARAQUE W ROSALES A GRANADILO A ROJAS M BIMANIS J 2001 Revista de la Facultad de Ciencias de Salud Universidad de Carobobo Vol 11 N 3
- MAKRIS M ROSENDAAL F y PRESTON E 1997 Familial Thrombophilia genetic risk factors and management J Intern Med 242 (supl 740) 9 15 págs
- MARGAGLIONE M BRANCACCIO V GIULIANI N D ANDREA G CAPPUCCI G 1998 Increased risk for venous thrombosis in carriers of the prothrombin G→A20210 gene variant Ann Intern Med 129 89 93
- MARTINUZZO M FORASTIERO R y KORDICH L 1999 Investigación en el laboratorio de los estados Trombofílicos Rev Soc Arg Hematología Vol 3 N 1
- MATEO J 2001 Prevalencia de las alteraciones biológicas causantes de trombofilia Tesis Hospital de la Santa Creu y Sant Pau Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Barcelona
- MAZZOLAI L y DUCHOSAI M 2007 Hereditary Thrombophilia and venous thromboembolism critical evaluation of the clinical implications of screening Eur J Endovasc Surg 34 483 88 págs
- MCPHERSON PINCUS Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods 21st ed 17
- MCGLENNEN R y KEY N 2002 Clinical and Laboratory Management of the Prothrombin G20210A Mutation Arch Pathol Lab Med 126 1319–1325 págs

- MIDDELDORP S 2007 Thrombophilia and pregnancy complications cause or association? *J Thromb Haemost* 5 (Suppl 1) 276 82 págs
- MILLER, J L 2007 Hemostasis and Thrombosis En *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods* Saunders Elsevier Ed 21 729 746 págs
- NELEN S 2000 Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss a metanalysis *Fertil Steril* 74(6) 1196 9 págs
- NEMERSON Y y NASSEL H 1982 The biology of thrombosis *Ann Rev Med* 33 479 88 págs
- NEWTON C 1989 Analysis of any point mutation in DNA The Amplification Refractory Mutation System (ARMS) *Nucleic Acid Res* 17 2503 2516 págs
- NORSTREM E THORELLI E y DHALBACK, B 2002 Functional characterization of recombinant FV Hong Kong and FV Cambridge *Blood* Jul 15 100(2) 524 30 págs
- OSINBOWALE O ALI L y CHI Y 2010 Venous thromboembolism a clinical review *Postgrad Med* Mar 122(2) 54 65 págs
- OTERO A POU FERRARI R DELLEPIANE M MUXI P DE LISA E ATTARIAN D PIERRI S y LENS D 2001 Pregnancy outcome in women with recurrent pregnant loss treated with enoxaparine *Trombosis and Haemostasis* Suppl July SIN 0340 6245 págs
- PABINGER I y VORMITTAG R 2005 Thrombophilia and pregnancy outcomes *J Thromb Haemost* 3 1603 10 46 págs
- PALOMO I PEREIRA J ALARCÓN M PINOCHET C VÉLEZ M HIDALGO P 2005 Factor V Leiden y mutación de la protrombina G20210A en pacientes con trombosis venosa y arterial *Rev Med Chile* 133 1425 1433
- PAYNTER, R A HANKINSON S E y HUNTER D J 2004 No Association between MTHFR C677T or A1298C Polymorphisms and Endometrial Cancer Risk *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13(6) 1088 89 págs
- PEAKE I R y MILLER, G J 1997 Co-inheritance of the 20210A allele of the prothrombin gene increases the risk of thrombosis in subjects with familial thrombophilia *Thromb Haemost* 78 1426 1429 págs
- POORT S R ROSENDAAL F R REITSMA P H y BERTINA R M 1996 A common genetic variation in the 3 untranslated region of the prothrombin gene is

associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis *Blood* Nov 15 88 36983703 págs

PONS E OTERO AM y POU R 2002 Consenso Uruguayo sobre SAF del embarazo Montevideo Agosto 18 19 págs

PRESS RD BAUER KA KUJOVICH JL y HEIT JA 2002 Clinical utility of factor V Leiden (R506Q) testing for the diagnosis and management of thromboembolic disorders *Arch Pathol Lab Med* 126 1304 1318 págs

PRESTON FE y ROSENDAAL FR 1996 Increased fetal loss in woman with heritable thrombophilia *Lancet* 348 913 págs

RAI R y REGAN L 2006 Recurrent miscarriage *Lancet* 368 601–11 págs

RAO AK y KAPLAN R 1998 Inherited thrombophilic states *Sem Thromb Hemost* 24 3 12 págs

RASPOLINI MR OLIVA E y ROBERTS DJ 2007 Placental histopathologic features in patients with thrombophilic mutations *J Matern Fetal Neonatal Med* 20(2) 113 23 págs

REY E KHAN S y DAVID M 2003 Thrombophilic disorders and fetal loss a meta analysis *Lancet* 361 901–08 págs

ROSENDAAL FR 1999 Risk factors for venous thrombotic disease *Thromb Haemost* 82 610–619 págs

ROSSENDORF A y DORFMAN M 2007 Activated Protein C Resistance and Factor V Leiden *Arch Pathol Lab Med* 131 866–871 45 págs

ROTHMAN K GREENLAND S 1998 *Modern epidemiology* 2nd edition Lippincott Raven

SAMANIEGO N RODRIGUEZ K CEDENO J SOTILLO L 2010 Factor V leyden (G1691A) protrombina (factor II G20210A) y Metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR C677T) en pacientes con perdida gestacional recurrente atendidas en el departamento de genetica del CH DR A A M en el periodo 2007 al 2010 Tesis Facultad de Medicina Universidad de Panamá

SEGAL JB BROTMAN DJ y NECOCHEA AJ 2009 Predictive value of Factor V Leiden and Prothrombin G20210A in adults with venous thromboembolism and in

- Family members of those with a mutation A systematic review JAMA 301 2472 2483 págs
- SEGERS K DAHLBACK B y NICOLAES G 2007 Coagulation factor V and thrombophilia Background and mechanisms Thromb Haemost 98 530–42 págs
- SELIGSOHN U y LUBETSKY A 2001 Genetic susceptibility to venous thrombosis N Engl J Med 344(16) 1222 1231 pags
- SOUTO J COLL I LLOBET D DEL RIO E OLIVER, A MATEO J 1998 The prothrombin 20210A allele is the most prevalent genetic risk factor for venous thromboembolism in the Spanish population Thromb Haemost 80 366 9
- SPECTOR, E B GRODY W W MATTESON C J PALOMAKI G E BELLISSIMO D B y WOLFF D J 2005 Technical standards and guidelines venous thromboembolism (factor V Leiden and prothrombin 20210G>A testing) a disease specific supplement to the standards and guidelines for clinical genetics laboratories Genet Med Jul Aug 7(6) 444-53 págs
- STIRRAT G M y LANCET A 1990 Recurrent miscarriage 336(8716) 673 675 págs
- TORRES J D CARDONA H y ALVAREZ L 2006 Inherited Thrombophilia is associated with deep vein thrombosis in a Colombian population Am J Hematol 81 933 37 págs
- TOSETTO A MISSIAGLIA E FREZZATO M RODEGHIRO F 1999 The VITA project prothrombin G20210A mutation and venous thromboembolism in the general population Thromb Haemost 82 1395 8
- VAN DER PUT N F GABREELS E STEVENS J A M SMEITINK F TRIBELS T ESKES L VAN DEN HEUVEL & H BLOM 1998 A Second Common Mutation in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene An Additional Risk Factor for Neural Tube Defects? Am J Hum Genet 62 000 000 págs
- WEISBERG I TRAN P y CHRISTENSEN B 1998 A Second Genetic Polymorphism in Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Associated with Decreased Enzyme Activity Mol Genet Metab Jul 64(3) 169 72 págs
- WHIZAR M y CISNEROS R 2008 Factor V Leiden y Anestesia Anestesiología y Medicina del Dolor Medico del Noroeste Tijuana B C Mexico Volumen 20 No 2

ZÖLLER B HILLARP A BERNTORP E y DAHLBACK, B 1997 Activated protein C resistance due to a common factor V gene mutation is a major risk factor for venous thrombosis Ann Rev Med 48 45 58 págs

ZÖLLER, B HILLARP A BERNTORP E y DAHLBACK B 1999 Thrombophilia as a multigenic disease Haematologica 84 59 70

ANEXOS

ANEXO 1

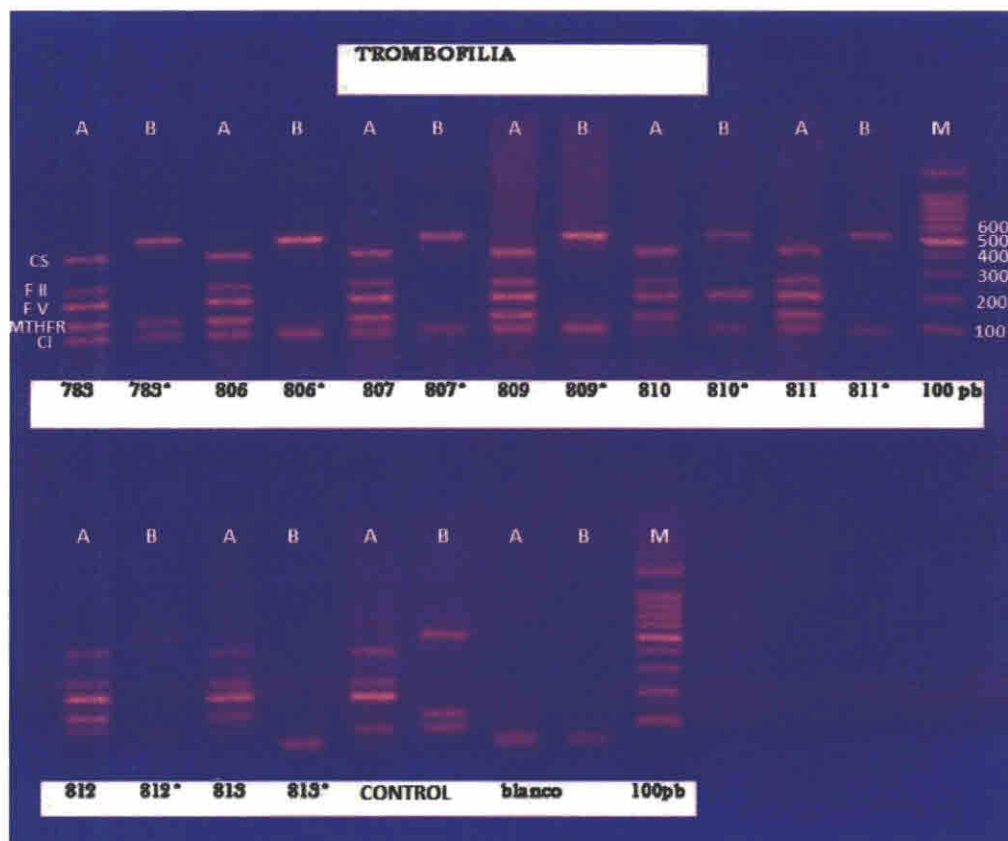


Figura 22. Electroforesis en Gel de agarosa 2% de pacientes a los cuales se les realizó la prueba de trombofilia.

- A:** Cebadores específicos para la amplificación de alelos no afectados por las mutaciones del factor V, del factor II ni de la MTHFR, cebadores de control (Superior e inferior).
- B:** Cebadores específicos para la amplificación de alelos afectados por las mutaciones del factor V, del factor II o de la MTHFR, cebadores de control (Superior e inferior).

ANEXO 2

MUESTRA	RESULTADOS		
	FACTOR V	FACTOR II	MTHFR
783	Homocigoto Normal	Homocigoto Normal	Heterocigoto Mutado
806	Homocigoto Normal	Homocigoto Normal	Homocigoto Normal
807	Homocigoto Normal	Homocigoto Normal	Homocigoto Normal
809	Heterocigoto Mutado	Homocigoto Normal	Homocigoto Normal
810	Homocigoto Normal	Homocigoto Normal	Homocigoto Normal
811	Homocigoto Normal	Homocigoto Normal	Homocigoto Normal
812	Homocigoto Normal	Homocigoto Normal	Homocigoto Normal
813	No Ampl. El Ci. Repetir	No Ampl. El Ci. Repetir	No Ampl. El Ci. Repetir
CONTROL	Homocigoto Normal	Homocigoto Normal	Homocigoto Mutado
BLANCO	No Ampl. Ok	No Ampl. Ok	No Ampl. Ok

Figura 23. Interpretación de la Electroforesis de un gel de agarosa 2% para la prueba de trombofilia presentado en el Anexo 1.